UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1963-1964 N° 831

Influence des Biostimulines sur l'Interaction de Substances Antibactériennes

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 17 mars 1964
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

BERNARD GANTER
Pharmacien

Diplômé de l'Institut de Pharmacie Industrielle de Montpellier

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur
J. MALGRAS, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1963

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1963-1964 N° 831

Influence des Biostimulines sur l'Interaction de Substances Antibactériennes

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 17 mars 1964
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

BERNARD GANTER
Pharmacien
Diplômé de l'Institut de Pharmacie Industrielle de Montpellier

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
P. CORDIER, Professeur
J. MALGRAS, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1963

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

ADMINISTRATION :

MM. GAZET DU CHATELIER, *Doyen*, I. ✪
SCHREIBER, *Assesseur*, I. ✪
CLADY, *Secrétaire*, I. ✪

PROFESSEURS :

MM.	SARTORY, O. ❋, I. ✪, O. ⚜	Bactériologie
	CORDIER, ❋, I. ✪	Pharmacie chimique
	DUQUÉNOIS, ❋, I. ✪, ⚜	Matière médicale
	JAEGER, ❋, I. ✪, ⚜	Botanique
	GAZET DU CHATELIER, I, ✪	Pharmacie galénique
	HASSELMANN, I. ✪	Chimie analytique
	SCHREIBER, I. ✪	Chimie organique
	MÉTAIS	Chimie biologique
	LAUSTRIAT	Physique

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	LEDOUX, ❋, ✪	Sciences naturelles
	MALGRAS	Sciences naturelles
	LAPP (f.f.)	Sciences physico-chimiques
	DIRHEIMER (f.f.)	Sciences appliquées

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	SARTORY	Cryptogamie
	CORDIER	Éléments de chimie organique
	DUQUÉNOIS	Hydrologie
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	HASSELMANN	Bromatologie
	SCHREIBER	Chimie générale
	MÉTAIS	Biochimie analyt. et séméiolog.
	LAUSTRIAT	Éléments de mathématiques
	LAVIGNE	Législation et Déontologie
	LEDOUX	Technique bactériologique
	MALGRAS	Sérologie et bactériologie
	LAPP	Chimie minérale
	MEYER	Comptabilité et fiscalité

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES :

Mme	KRISTENSEN	Chimie pharmaceutique
Mme	OURISSON	Histoire naturelle
MM.	MATHIS	Chimie
	STAHL	Bactériologie et Parasitologie
	ROMOND	Bactériologie
	WERMUTH	Chimie
	JUNG	Physique

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur R. SARTORY

Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Juges,

Monsieur P. CORDIER

Professeur de Pharmacie Chimique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur J. MALGRAS

Maître de Conférences de Sciences Naturelles
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de sincère reconnaissance.

A mes Parents,

je dédie ce travail en témoignage d'affection filiale et en reconnaissance de tout ce que je leur dois.

Aux Laboratoires A. H. ROBINS Co à Richmond, U.S.A.

Au cours du stage qu'il m'a été donné de faire dans ces Laboratoires, et grâce à la coopération de ses dirigeants, j'ai pu jeter les premières bases de ce travail.

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, la microbiologie et la chimie biologique s'intéressent à des recherches sur des produits naturels ou synthétiques possédant, à des doses infinitésimales, une *nette action biostimulante* sur des micro-organismes et dont la carence occasionne des troubles métaboliques qui se manifestent surtout par un ralentissement et un affaiblissement de la croissance.

Dans ces recherches un grand pas en avant a été fait par nos connaissances actuelles des *vitamines, coenzymes et acides aminés*, dont certains sont connus comme facteurs accessoires indispensables chez des organismes supérieurs.

Par choc en retour, l'*étude des Biostimulines des micro-organismes* a largement contribué au développement de nos connaissances sur les vitamines. Ainsi, certains micro-organismes sont aujourd'hui les meilleurs germes-test pour déceler et doser des facteurs de croissance naturels ou synthétiques pouvant être rangés dans *le grand groupe des vitamines*, ce terme étant considéré dans son sens le plus large.

Le rôle éminent de ces micro-organismes dans la découverte de nouveaux facteurs de croissance ressort des exemples connus : *l'Acide folique, le groupe des Vitamines* B_6 *et* B_{12}, *la Streptogénine*, etc. La mise en évidence de son action biologique a prouvé *l'existence de relations étroites entre les vitamines proprement dites et les acides aminés.*

Les recherches expérimentales récentes ont indubitablement prouvé que les *amino-acides* constituent des métabolites aussi importants que les *vitamines, les ferments et les hormones.* De plus, on connaît actuellement la fonction biologique de certaines de ces *biostimulines*, leur relation avec des systèmes enzymatiques donnés. Ces faits étudiés chez les micro-organismes ont permis de se faire une opinion sur leur action analogue chez les organismes supérieurs, découvertes qui ont eu une importance imprévisible sur le plan médical.

L'étude des problèmes concernant les *Biostimulines* a d'autre part permis de démontrer *que ces facteurs de croissance microbiens sont en compétition avec des inhibiteurs de croissance*, et il faut reconnaître qu'il existe dans les processus biologiques une interaction importante entre les stimulines et leurs antagonistes naturels.

On connaît aujourd'hui l'importance de ce problème des facteurs stimulants et inhibiteurs de croissance. De nombreuses questions restées

ouvertes prouvent que l'on ne peut pas orienter les recherches dans l'une ou l'autre direction seulement, mais que l'on a affaire à un ensemble de problèmes complexes tributaires les uns des autres.

Le terme de « *facteur de croissance* » somme toute très vague, est entré dans l'usage courant des botanistes, des microbiologistes, des physiologues, etc.; il désigne des biocatalyseurs en partie activant, en partie régularisant les processus physiologiques et métaboliques aussi bien animaux que végétaux. *Suivant l'origine et le terrain biologique de ces biocatalyseurs, ils se rapprochent ou font partie des vitamines, des hormones animales, des phytohormones, des acides aminés, des ferments et des Biostimulines.* Comme on le voit, les facteurs de croissance ne jouent pas seulement un rôle en microbiologie, mais interviennent d'une façon aussi manifeste chez tous les organismes vivants dans leur ensemble.

En ce qui concerne les *produits antagonistes* que nous trouvons dans la nature, il faut distinguer entre les antibiotiques proprement dits et les substances inhibitrices que l'école russe a désignées par le terme de « *phytoncides* ». Il s'agit là de produits bactéricides, protisticides et fongicides qui ont une certaine action immunisante ou protectrice sur les végétaux qui les élaborent. On voit que le terme de « *phytoncide* » a une signification beaucoup plus large que celui *d'antibiotique*. En effet, le mot antibiotique dérive du grec « *antibios* » et a été choisi par opposition à celui de « *symbiose* ». Il désignait initialement l'antagonisme biologique qui existe entre certains micro-organismes vivants. L'antibiose est le contraire de la symbiose, la concurrence vitale entre deux organismes, l'un produisant une ou plusieurs substances spécifiques, dites « *antibiotiques* », qui rendent tout voisinage intolérable à l'autre. A l'origine les phénomènes d'antibiose se concevaient principalement pour les végétaux microscopiques, mais au cours des dernières années, et depuis l'ère de la Pénicilline, la définition du terme antibiotique s'est élargie et son domaine ne se limite plus uniquement aux êtres inférieurs : bactéries et champignons. Les plantes supérieures élaborent également des principes antimicrobiens qui, souvent, ne sont pas moins actifs ou moins spécifiques que la Pénicilline, Streptomycine, Auréomycine, etc. Ainsi nous savons depuis fort longtemps que les plantes supérieures peuvent également se protéger contre les organismes nuisibles par la production de substances plus ou moins spécifiques, inhibant la croissance de ces agents pathogènes.

Il est donc possible que des substances phytoncides de plantes supérieures ou des antibiotiques de micro-organismes agissent en stimulant le pouvoir protecteur des tissus de l'homme ou de l'animal malade et cette action ne serait par conséquent pas antibiotique, mais au contraire « *biotique* ».

Les phytoncides d'une plante donnée peuvent posséder des propriétés antibiotiques plus ou moins marquées, *mais n'importe quel antibiotique d'une plante quelconque n'est pas forcément un phytoncide.* Ainsi, on pourrait considérer la quinine comme antibiotique en ce qui concerne les agents du paludisme, puisqu'elle possède des propriétés antipara-

sitaires chez l'homme; mais nous ne savons pas, jusqu'à présent, si ce corps agit pareillement dans la protection de la plante même, donc si elle est en rapport avec l'immunité naturelle de cette plante.

On voit ainsi la différence entre l'« *antibiotique* » qui a une action sur le micro-organisme étranger à l'organisme producteur et le « *phytoncide* » qui agit également sur des micro-organismes étrangers, mais protège en même temps l'organisme producteur.

En considérant le problème sous cet aspect, on voit qu'il y a une grande différence entre antibiotiques et phytoncides; en effet ces derniers doivent présenter les propriétés suivantes :

— Ce sont des produits élaborés par un végétal en vue de le protéger ou de l'immuniser.

— Il s'agit le plus souvent de substances volatiles.

— Ils ne sont pas seulement antimicrobiens, mais également protisticides.

Le but de notre travail était d'étudier le comportement des antibiotiques les uns vis-à-vis des autres; d'autre part, de contrôler l'interaction possible entre ces antibiotiques et des facteurs de croissance : synergie ou antagonisme.

La découverte récente des propriétés allométatrophiques des *Lactobacilles* et du *Zymomonas mobile* permet enfin d'entreprendre de telles recherches.

Avant d'entrer dans le vif de notre sujet, nous ne voudrions pas manquer d'exprimer ici notre reconnaissance à Monsieur R. Sartory, *Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.* Il nous a aimablement accueilli dans son laboratoire et nous fait aujourd'hui le grand honneur de présider notre jury de thèse.

Nos remerciements vont également à Monsieur P. Cordier, *Professeur de Pharmacie Chimique*, et à Monsieur J. Malgras, *Maître de Conférences de Sciences Naturelles à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, pour la gentillesse avec laquelle ils ont bien voulu accepter de siéger dans ce jury.

Monsieur J. Meyer, *ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, a droit à notre gratitude toute particulière. En effet, instigateur de ce travail, il nous a encouragé et soutenu au cours de son élaboration, nous aidant dans une large mesure à atteindre le but que nous nous étions fixé.

PLAN DE TRAVAIL

Nous donnons tout d'abord *un historique* concernant les substances antibactériennes. Dans le *Chapitre I* nous envisageons cette question au point de vue général et nous essayons de donner une définition différentielle *des produits désinfectants, des antiseptiques, des agents chimiothérapeutiques et antibiotiques.* Finalement, nous donnons une argumentation sur le mode d'action des substances antibactériennes.

Dans le cadre de notre travail, nous envisageons dans le *Chapitre* II, *l'antagonisme* entre les facteurs de croissance et les substances antibactériennes. En effet, *le but de nos expériences est de déterminer l'activité des facteurs de croissance et en particulier des Biostimulines d'origine végétale;* à ce sujet nous préparons un extrait de germes de maïs qui répond à la définition *des facteurs biogènes ou stimulines de* FILATOV.

Le Chapitre III a trait à l'étude des antibiotiques proprement dits et de leur antagonisme réciproque. Nous englobons dans le terme d'« *antibiotiques* » des produits d'origine biologique ou de synthèse chimique.

Nos travaux personnels seront exposés en quatre chapitres, dont le premier concerne le dosage des antibiotiques par des méthodes microbiologiques. Comme exemple, nous citons le dosage de la Pénicilline, du Chloramphénicol et des Sulfamides. Pour ces derniers, nous sommes obligé d'avoir recours à des dosages chimiques dans le cas où nous travaillons avec des mélanges de produits antibactériens biologiques ou chimiothérapiques.

Le Chapitre V est réservé à la description du *dosage des Biostimulines* où nous utilisons comme substrat le moût de bière, contenant naturellement *des Biostimulines, et le Pantothénate Assay Medium de Difco* complété par du pantothénate de calcium. Il s'agit donc d'un milieu synthétique dépourvu de produits biogènes. Comme bactérie-test nous avons recours à *Zymomonas mobile Lindner.* Nous adoptons la méthode gazométrique élaborée par FAUDI.

Dans le Chapitre VI nous contrôlons l'interaction *des substances antibactériennes* et, en nous basant sur la classification de MANTEN et WISSE et de P. KLEIN, nous envisageons successivement *le synergisme additif, la potentialisation, l'activité catalytique, l'antagonisme, l'interférence et l'action frénatrice.*

Dans le Chapitre VII nous reprenons les mêmes expériences en présence *de Biostimuline* pour contrôler son influence sur ces interactions.

Des Conclusions Générales terminent notre exposé.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

LES SUBSTANCES ANTIBACTÉRIENNES

Les médicaments utilisés pour lutter contre les bactéries pathogènes ne comportaient guère jusqu'en 1935, *à côté des vaccins et des sérums thérapeutiques, que les substances antiseptiques et désinfectantes.* Les unes et les autres sont des produits chimiques capables soit de s'opposer à la multiplication des microbes, soit de la retarder (action bactériostatique ou antigénétique), soit encore de les tuer définitivement (action bactéricide), selon qu'elles sont utilisées à concentration plus ou moins forte et que leur action s'exerce pendant un temps plus ou moins prolongé.

Désinfectants :

On réserve généralement le nom de *désinfectants* aux produits destinés à détruire les germes pathogènes partout où ils se trouvent en dehors des êtres vivants, dans le milieu extérieur (eau, air, locaux, objets de contact, linge, excrétats, etc.). Aucune limite ne s'oppose alors aux concentrations utilisables (hormis le risque de détérioration de certaines matières), ou à la possibilité d'utilisation ultérieure du produit désinfecté. Aussi ces substances peuvent-elles exercer au maximum leur action léthale (bactéricide). On les utilise en hygiène pour réaliser la désinfection surtout terminale.

Antiseptiques :

Les substances antiseptiques sont plus spécialement celles qui doivent inhiber ou détruire localement les germes pathogènes chez les êtres vivants, sur un tégument, dans une plaie infectée, une cavité naturelle ou pathologique, une fistule, etc. Il y a donc lieu de tenir compte, dans l'antisepsie locale, qu'elle s'exerce par contact, que la nocivité propre des substances employées agit sur les cellules et tissus de l'organisme infecté. Les concentrations utilisables se trouvent de ce fait limitées.

Aucune propriété fondamentale ne distingue donc antiseptiques et désinfectants, si ce n'est le fait que les premiers sont utilisés en thérapeutique humaine ou animale, les seconds en hygiène générale. Une même substance chimique peut selon la concentration à laquelle on l'utilise, et selon le temps pendant lequel elle agit, *inhiber la multiplication des bactéries ou les détruire définitivement.*

Agents chimiothérapeutiques et antibiotiques :

On doit maintenant adjoindre aux antiseptiques et aux désinfectants deux autres groupes de corps susceptibles d'inhiber provisoirement ou définitivement, de façon plus ou moins spécifique, le développement des bactéries dans l'organisme même. Ces corps nouveaux permettent de réaliser une *antisepsie générale*, mais doivent être peu toxiques aux concentrations actives antibactériennes. Ils peuvent donc être introduits dans l'organisme malade par voie digestive ou parentérale. Ils agissent alors en diffusion par voie sanguine et vont éventuellement atteindre les bactéries dans le foyer infecté. Ils se montrent capables, judicieusement employés, de stopper l'évolution d'une infection générale ou locale.

Ce sont d'une part *des dérivés chimiques de synthèse*, nés avec l'avènement *des sulfamides* et appelés « *médicaments chimiothérapiques* »: d'autre part, des *substances antibiotiques* soit synthétiques, soit d'origine biologique, élaborées par des champignons, des bactéries, des végétaux ou des animaux.

Ces nouvelles substances agissent de façon beaucoup moins brutale, plus spécifique, en perturbant généralement le métabolisme des bactéries qui perdent ainsi la faculté de se multiplier dans l'organisme et deviennent alors vulnérables par les facteurs de défense naturelle de l'organisme. Il faut noter qu'ils peuvent aussi agir localement, par voie externe.

Dans ce cas, ils se comportent comme de véritables antiseptiques. D'autre part, au moment où ces substances, dites *antibiotiques d'origine biologique*, sont préparées par synthèse, elles correspondent à la définition des agents chimiothérapiques.

On voit ainsi que la limite entre ces différents produits est peu nette et il est difficile de les classer « *sensu stricto* » dans l'un ou l'autre groupe établi par les définitions antérieures.

Agents chimiothérapiques :

Ces produits de synthèse représentent les produits chimiques capables d'agir d'une façon spécifique contre les maladies infectieuses de l'homme ou de l'animal. Ils doivent cette faculté à leur coefficient chimio-thérapique élevé, celui-ci étant défini *par le rapport entre la dose maximale non toxique pour l'organisme et la dose minimale curative pour un être donné :*

$$\frac{\text{D.M.T. (dose maximale tolérée)}}{\text{D.M.C. (dose minimale curative)}}$$

Plus ce rapport est grand, plus les possibilités d'utilisation sont étendues. Cette même qualité se retrouve chez les substances antibiotiques.

Antibiotiques :

Les substances antibiotiques sont des produits chimiques d'origine biologique élaborés par les micro-organismes vivants ou les végétaux par biosynthèse. Elles sont capables, à très faible concentration (de l'ordre du μ/ml ou du γ/ml) de s'opposer à la multiplication de certaines espèces bactériennes.

Le terme « *antibiotique* » a vu se modifier sa définition et s'étendre ses limites. Le mot « *antibios* » était utilisé pour la première fois par VUILLEMAIN dès 1889 pour désigner toute substance capable de produire une antibiose, c'est-à-dire, de s'opposer à la vie. Il y a donc une controverse : l'antibiotique qui s'oppose à la vie bactérienne sauve l'organisme supérieur infecté.

A l'ère des substances antiseptiques, le terme *antibiotique* traduisait l'action bactéricide d'une substance chimique ; il était opposé au terme « *antigénétique* », ce dernier traduisant l'action bactériostatique, c'est-à-dire la faculté d'inhiber la multiplication des germes.

Actuellement, la signification de ce terme a été détournée au profit de substances antimicrobiennes élaborées par des micro-organismes vivants. Puis il s'est étendu à toutes les substances antimicrobiennes élaborées par des organismes vivants (algues, cryptogames inférieurs, phanérogames, animaux, etc.). On l'adopte maintenant également pour désigner les dérivés anti-infectieux obtenus par synthèse. On parle donc *d'antibiotiques naturels et d'antibiotiques synthétiques.*

Mode d'action des substances chimiques antibactériennes :

Le mode d'action varie selon la nature de la substance et selon qu'elle exerce sur les bactéries une action *bactériostatique* ou *bactéricide*. Cette dernière, réservée aux substances désinfectantes, entraîne une désorganisation et une destruction plus ou moins rapide des constituants structuraux de la bactérie. L'action bactériostatique s'exerce de façon moins brutale, en inhibant quelques fonctions biologiques nécessaires à la nutrition, à la croissance ou à la multiplication des germes. *Le mode d'action des diverses substances antibactériennes n'est compréhensible que dans la mesure où l'on connaît la structure et la physiologie des bactéries.*

Du point de vue fonctionnel, nous savons que le protoplasme bactérien est particulièrement riche en *enzymes* chargés de catalyser de façon spécifique les multiples réactions chimiques qui représentent l'activité métabolique de la cellule. Ces enzymes comportent notoirement une fraction protéique variable (*apoferment*) responsable de la spécificité, liée à un groupement prosthétique non protéique. lipidoglucidique, appelé *coenzyme*, qui comporte souvent dans sa molécule une *substance*

vitaminique comme nous allons le voir. Ces systèmes enzymatiques permettent aux bactéries de dégrader les molécules complexes du milieu où elles vivent en éléments plus simples, assimilables, et de constituer à partir de ces corps simples leurs propres matériaux. Les bactéries assurent ainsi *leur croissance* (augmentation du protoplasme de chaque unité cellule bactérienne) *et leur multiplication* (augmentation du nombre des bactéries viables), tout en produisant éventuellement des substances spécifiques : pigments, facteurs de virulence, toxines, substances antibiotiques, etc. Les bactéries sont douées d'un remarquable *pouvoir d'adaptation* au milieu environnant, dont elles sont étroitement solidaires. Cette adaptation s'accompagne d'une modification de leur équipement enzymatique.

Les exigences nutritives des bactéries sont les mêmes que celles des êtres supérieurs. Il leur faut, à côté des éléments essentiels à leur structure (eau, sels minéraux, acides aminés, protides, glucides et lipides), de très petites quantités de substances rappelant les vitamines des êtres supérieurs. Ces corps peuvent être de nature vitaminique proprement dite, *Aneurine*, *Riboflavine*, etc., et représentent souvent des constituants essentiels des coenzymes. Les diverses bactéries présentent à ce point de vue des capacités très différentes. Certaines sont capables de synthétiser ces métabolites essentiels, totalement ou partiellement : dans ce cas, il faudrait envisager ces vitamines comme des « *hormones bactériennes* ». D'autres bactéries sont incapables de cette synthèse et doivent, pour croître et se multiplier, les trouver préformés dans le milieu où ils vivent. On a alors affaire à *des vitamines dans le vrai sens du mot* et on parle également dans ce cas de *facteurs de croissance*. La connaissance de ces facteurs a permis la recherche, sur des bases rationnelles, de nouveaux médicaments anti-infectieux : connaissant l'un ou les facteurs de croissance indispensables au développement d'une espèce bactérienne donnée, *on peut en effet espérer entraver sa multiplication en introduisant dans le milieu une substance (antimétabolique) capable d'entrer en compétition avec ce facteur et de bloquer ainsi la synthèse d'un constituant essentiel.* Nous aurons l'occasion de revenir sur cette question en expliquant l'action des sulfamides, remplaçant le métabolite naturel et essentiel : *l'Acide para-aminobenzoïque*, pour un grand nombre de bactéries.

Mécanisme de l'action bactériostatique :

L'action bactériostatique nécessite un stade initial de fixation à la surface de la bactérie, précédant la phase d'inhibition et de pénétration. Cette dernière, qui touche la vitalité de la bactérie même, mène à la bactéricidie.

Le stade initial de fixation est encore mal connu : on a pu observer la fixation de quelques antiseptiques ; certains ions métalliques, le *Sublimé* principalement (Suppfle, 1903), ainsi que les *savons cationiques* (Dubois, 1944) se fixent sur la couche superficielle du protoplasme. Les antiseptiques s'associent aux constituants lipidiques en combinaison facile-

ment dissociable. La fixation des sulfamides semble se localiser surtout à la membrane bactérienne qui s'altérerait particulièrement (Levaditi). Il en serait de même pour la Streptomycine (Werner, 1950). *L'activité des substances à action bactériostatique doit être conditionnée par la nature et les propriétés des enveloppes bactériennes.* Ainsi les bactéries *Gram-positives* et *Gram-négatives*, dont les enveloppes cellulaires semblent être de constitution dissemblable et de perméabilité différente, présentent outre des exigences nutritives diverses, une sensibilité élective différente à l'égard de certains antiseptiques : substances colorantes, détergents cationiques, sulfamides et antibiotiques.

La rapidité d'action d'un agent bactériostatique est ainsi en relation avec sa fixation sur les parois cellulaires, qui varie avec les propriétés physico-chimiques de la substance : solubilité plus ou moins marquée dans l'eau ou dans les lipides, degré d'ionisation, ainsi qu'avec les propriétés de ces solutions : tension superficielle, etc.

Si le contact de l'agent nocif avec la bactérie n'a pas été trop prolongé, ce stade de fixation peut être réversible. On peut en effet désintoxiquer des germes apparemment tués par un contact limité avec un antiseptique. Ce fait peut être obtenu par lavage à l'eau ou à l'eau albumineuse (*Phénol*), par addition d'adsorbant comme le noir animal (*Sublimé*), ou mieux, par neutralisation chimique. Les dérivés contenant dans leur molécule des *groupements thiol* (—SH) ou *dithiol*, tels que *Cystéine*, *Glutathion*, *Acide thioglycolique*, se montrent capables de désintoxiquer les bactéries traitées par les dérivés mercuriels de certains autres antiseptiques.

L'action des *détergents anioniques ou cationiques*, dont la molécule comporte de longues chaînes latérales lipophiles, peut être empêchée par addition au milieu d'une quantité minime de *phospholipides*.

L'Acide para-aminobenzoïque neutralise l'action bactériostatique des sulfamides. *L'hydroxylamine* neutralise l'action bactériostatique de la Pénicilline.

Le mécanisme intime de l'action bactériostatique et bactéricide est mal connu: nous pouvons examiner ce fait en envisageant la classification suivante :

Substances antiseptiques :

Notre conception de cette activité a beaucoup évolué depuis l'apparition des nouveaux médicaments antibactériens et les recherches qu'ils ont suscitées. Au lieu de considérer les substances antiseptiques comme des agents toxiques, agissant exclusivement par oxydation brutale, réduction, action dénaturante, à l'égard des protéines, on entrevoit la possibilité qu'elles peuvent agir en *inhibant de façon véritablement spécifique quelque groupement structural ou quelque échelon d'un processus métabolique essentiel à la vie du germe*, comme l'avait entrevu Ehrlich au premier jour de la chimiothérapie. Des dérivés mercuriels agiraient

par exemple en se combinant avec quelque groupement sulfhydrylé des constituants protéiques. Les Phénols inhiberaient certains enzymes (*déhydrogénases*) tout en se combinant avec certains groupements aminés superficiels des protéines. Chaque substance aurait ainsi, selon sa nature chimique, un point ou même plusieurs points d'attaque particuliers.

D'autres substances cependant seraient capables de désorganiser rapidement la structure bactérienne (les détergents), dissociant certaines de ses protéines conjuguées et inhibant ainsi rapidement leur métabolisme.

Dérivés sulfamidés :

Ces dérivés ne sont pas bactéricides aux concentrations utilisables. Ils exercent « *in vitro* » et « *in vivo* » une simple bactériostase, qui disparaît avec l'élimination du sulfamide. Cette inhibition de la vitalité et de la multiplication ne se manifeste qu'autant qu'elle s'exerce sur une faible quantité de germes. Diverses hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme intime de l'action des dérivés sulfamidés. Selon certains auteurs (SHAFFER) le sulfamide serait converti dans l'organisme en dérivés d'oxydation hydroxylaminés (—NHOH). Ceux-ci agiraient alors sur certains constituants cellulaires (Hémoglobine, Glutathion, Acide ascorbique) et surtout sur la catalase, entraînant une accumulation nocive de H_2O_2 à l'intérieur du corps bactérien.

L'hypothèse de WOODS, basée sur l'action antisulfamide de certains constituants, est admise par de nombreux auteurs, qui supposent que le sulfamide agit en interférant avec un élément essentiel donné de la bactérie et vraisemblablement avec une réaction enzymatique dont *l'Acide para-aminobenzoïque* est un composant essentiel du substrat.

En effet, certaines substances dites *antisulfamides* inhibent « *in vitro* » et « *in vivo* » l'action bactériostatique d'un sulfamide donné. Parmi ces substances, il faut citer *l'Acide para-aminobenzoïque*. Cet acide est un métabolite essentiel pour toutes les bactéries et constitue un facteur de croissance pour beaucoup d'espèces bactériennes. On sait actuellement qu'il entre dans la constitution d'autres facteurs de croissance importants, tels que l'Acide folique, lui-même constituant d'un enzyme nécessaire à la synthèse des purines.

L'analogie de structure entre *l'Acide para-aminobenzoïque* et *l'Acide sulfanilique*, noyau des sulfamides, ressort des deux formules :

Acide para-aminobenzoïque

Acide para-amino-benzo-sulfonique ou acide sulfanilique.

Ceci a conduit à l'idée que le *Sulfanilamide* agissait en bloquant l'Acide para-aminobenzoïque dans la chaîne des réactions métaboliques, dans

lesquelles il intervient sans pouvoir en remplir les fonctions. Privé de ce facteur indispensable, le métabolisme bactérien interrompu ne peut plus se poursuivre normalement, la synthèse du protoplasme devient impossible, et la multiplication s'arrête. La vraisemblance de cette substitution est renforcée par l'identité des spectres d'absorption du sulfamide et de l'Acide para-aminobenzoïque, tel que TREFOUËL l'a démontré.

On a reconnu depuis d'autres faits d'interférence d'origine structurale. D'autres dérivés, soufrés ou non, se sont montrés capables d'inhiber l'action de l'Acide para-aminobenzoïque. D'autres couples antagonistes ont été recherchés et on en a synthétisé un grand nombre dans l'espoir de trouver parmi eux des substances bactériostatiques; mais beaucoup de ces *antimétabolites* se sont montrés dépourvus d'action thérapeutique. L'utilisation des antimétabolites est de ce fait limitée. Leur recherche a cependant donné une grande impulsion aux études de la physiologie moderne. On lui doit, par exemple, la découverte de *l'Acide para-aminosalicylique comme antimétabolite du bacille tuberculeux*. Nous reviendrons sur ces questions plus en détail.

Substances antibiotiques :

Leur mécanisme d'action est encore fort mal connu. Il ne semble pas s'exercer en perturbant le mécanisme des biosynthèses, auquel participent les vitamines du groupe B; les antibiotiques semblent dévier le cours normal des processus biochimiques qui règlent la division cellulaire, la scission et l'agencement du matériel nucléaire.

La Pénicilline, en effet, en agissant « *in vitro* » sur des bactéries sensibles, fait apparaître une dissociation entre les phénomènes de croissance et de multiplication. A dose sub-bactériostatique, les bactéries continuent à former de la matière protoplasmique, mais sans que se produise le phénomène de division, d'où apparition de formes géantes; ce phénomène traduit sans doute une atteinte élective du matériel nucléaire.

Ainsi, la Pénicilline agirait sur les *bactéries Gram-positives* en perturbant le métabolisme de *l'Acide ribonucléique*. Ce freinage porterait surtout *sur l'hydrolyse de la liaison osidique*, c'est-à-dire sur l'inhibition de certaines nucléosidases. Il se produirait parallèlement certaines modifications du métabolisme protidique, observées chez les *bactéries Gram-positives* en période de croissance, et liées peut-être à des modifications de perméabilité de la cellule bactérienne. La Pénicilline semble en effet supprimer la faculté que possèdent les bactéries Gram-positives, sensibles à son action, d'assimiler *l'Acide glutamique* présent dans le milieu. Or, cet amino-acide est nécessaire à la synthèse de leurs protéines et elles se montrent incapables de la synthétiser elles-mêmes à partir d'une source d'azote minéral.

Les *germes Gram-négatifs* et les *bactéries Gram-positives pénicillino-résistantes* peuvent au contraire en réaliser la synthèse partielle à partir

d'Ammoniaque et de *Thiamine*, sans devoir le capter dans le milieu ambiant. On suppose que la Pénicilline intervient en effet en bloquant la synthèse d'un constituant phosphoré encore inconnu, dont l'utilisation serait couplée avec le métabolisme protidique.

Il faut retenir à ce sujet que nous différencions trois sortes de Staphylocoques :

1) *Les Staphylocoques pénicillino-sensibles du genre de la souche d'Oxford.*

2) *Les Staphylocoques résistants par production de Pénicillinase.* Le critère différentiel entre ces deux variétés ressort du taux de Pénicilline, variant peu pour le premier groupe, alors que l'on constate pour le second groupe une grande variation de résistance par rapport à la dose d'inoculat initial.

3) *La dernière catégorie est constituée par le Staphylocoque résistant d'emblée* et qui provient soit de lésions pathologiques, soit d'isolement par séparation des germes. Il s'agit ici d'une résistance somatique qui se manifeste jusqu'à un taux donné fixe de Pénicilline et qui ne varie pas avec la dose d'inoculat.

On peut sélectionner ce groupe de Staphylocoques par isolement en culture sur milieu contenant de la Pénicilline à taux élevé, mais subléthal pour ces Staphylocoques donnés.

Après avoir exposé les généralités concernant les antibiotiques et les médicaments chimiothérapiques, nous allons dans le chapitre suivant traiter de *l'antagonisme de ces différents produits.*

CHAPITRE II

ANTAGONISME ENTRE LES FACTEURS DE CROISSANCE ET LES SUBSTANCES ANTIBACTÉRIENNES

Nous allons situer le problème qui nous intéresse en prenant comme exemple l'interaction entre *l'Acide para-aminobenzoïque ou l'Acide folique* d'un côté, et *les Sulfamides et l'Acide 7-méthylfolique* de l'autre côté.

L'intéressant problème des *systèmes facteurs de croissance et leurs inhibiteurs* a été soulevé indirectement par les recherches tendant à mettre au point des médicaments antibactériens destinés à lutter contre les maladies infectieuses. Ces travaux, qui pendant de longues années n'ont guère évolué, ont marqué un grand pas en avant en 1934 par la découverte des *sulfamides* par Domagk (1). La thérapeutique avait ainsi à sa disposition un certain nombre de médicaments spécifiques surtout contre les *Coques* et les *Anaérobies*. Mais le mécanisme d'action de ces produits, agissant contre des groupes très différents de bactéries pathogènes, n'a pas pu être élucidé à cette époque.

Les rapports entre *l'action antimicrobienne des sulfamides et leur constitution* ont seulement trouvé leur explication à la suite des progrès faits *en vitaminologie*, qui ont permis de pénétrer plus avant dans le domaine des relations de ces substances naturelles avec le métabolisme des micro-organismes.

Mœller a constaté pour la première fois que les *bacilles lactiques*, à l'opposé de la plupart des autres micro-organismes, sont des germes très exigeants, puisqu'il leur faut toute une série de facteurs de croissance pour leur développement normal. Parmi ces agents stimulants se trouvait une substance encore inconnue à ce moment, décelable dans un grand nombre d'aliments. Ce facteur, initialement désigné par le terme de « *Vitamine H'* » a été identifié comme étant *l'Acide para-aminobenzoïque* à la suite des travaux de Rubbo et Gillespie (2) qui ont pu démontrer que la croissance de *Clostridium acetobutylicum*, parmi un certain nombre d'autres micro-organismes, est fortement stimulée par cet acide.

Mœller a ensuite mis au point un milieu de culture synthétique qui, additionné *d'Acide para-aminobenzoïque*, a provoqué une croissance optimale de bactéries lactiques, et en particulier de *Streptococcus plantarum*. Ce milieu contient, à côté de certains sels minéraux, du glucose, différents acides aminés et six vitamines du groupe B.

En employant ce substrat, Mœller et Schwarz (3) ont constaté que *l'Acide para-aminobenzoïque* agissait déjà à une concentration de $1,6 \times 10^{-10}$ en permettant un rendement maximal des cultures. Il s'agit en effet d'une action compétitive entre *l'Acide para-aminobenzoïque et l'Acide para-amino-sulfobenzoïque*. Nous aurons l'occasion de revenir sur cette question.

Richou et Gerbeaux (4) ont poursuivi les travaux commencés par Ramon dès 1942 particulièrement en ce qui concerne *les ferments du Bacille subtilis*. Ils ont recherché surtout les différentes propriétés des filtrats de culture du *Bacille subtilis*, de *Penicillium notatum et d'Actinomyces griseus*. Leurs investigations avaient donc pour but de rechercher l'action de la *Subtiline*, de la *Pénicilline* et de la *Streptomycine* purifiées, pour y déceler des principes antidotiques, diastasiques et virulicides.

Richou et Lissot (5) ont recherché le pouvoir antibiotique de différents complexes à base de *Streptomycine* vis-à-vis d'un certain nombre de *Salmonella*, telles que *gallinarum, pullorum, enteritidis Gaertner, Chester et typhimurium*. Ils ont également constaté que le filtrat de culture de *Bacille subtilis* est doué de propriétés antibiotiques vis-à-vis du *Bacille diphtérique, du Bacille de Preisz-Nocard, du Coccobacille de la pseudo-tuberculose, du Bacille de la peste et de la Bactéridie charbonneuse*. L'action antibiotique de *la Pénicilline contre les Staphylocoques* et la plupart des autres bactéries Gram-positives est connue.

Au cours de leurs recherches, ces différents auteurs ont mis en évidence dans le filtrat de culture *de Bacille subtilis, de Penicillium notatum et d'Actinomyces griseus*, une action inhibitrice également très manifeste « *in vitro* » et « *in vivo* » contre des poisons microbiens, tels que les exotoxines diphtériques, tétaniques, staphylococciques et gangréneuses: ils ont désigné cette propriété par le terme « *d'action antidotique* ».

Dans le même ordre d'idées, Hauduroy et Rosset (6) ont mis en évidence dans les filtrats de *Penicillium notatum*, des substances antidotiques capables d'anéantir la toxicité propre de la *Tuberculine*. Ces recherches ont été confirmées par une action similaire sur la *Tuberculine* par les filtrats de culture de *Bacille subtilis et d'Actinomyces griseus*.

Anderson et Booderson (7) ont injecté à des souris des endotoxines de *Salmonella Aertryke* et ont constaté que celles qui recevaient simplement l'endotoxine mourraient rapidement, alors que les animaux auxquels ils avaient injecté en même temps des *Pénicillines impures* survivaient. Cette activité antidotique des filtrats culturaux est relativement grande: il suffit, par exemple, à certains d'entre eux de quelques heures pour détruire « *in vitro* » à la température de 37° des centaines de doses hémolytiques de *toxines staphylococciques* ou une quantité de doses de *toxines diphtériques* représentant 100 doses mortelles pour le cobaye. La destruction totale du pouvoir toxique de ces poisons microbiens sous l'effet des différents filtrats de culture s'accompagne de la disparition de leur pouvoir floculant et de leur activité immunisante.

D'après Richou et Gerbeaux, il semble qu'il s'agit de la part des filtrats d'une manifestation de *nature enzymatique*. Ils interviennent, non pas en neutralisant plus ou moins les poisons bactériens à la manière *d'une antitoxine*, mais en les décomposant irréversiblement et définitivement, en leur faisant perdre à la fois leurs propriétés toxiques et antigéniques. C'est pourquoi les auteurs ont créé le terme « *antidotique* » en le justifiant par le fait que le mot « *antidote* » désigne étymologiquement une substance capable d'anihiler la nocivité d'un poison, soit en le décomposant, soit en se combinant avec lui. Il n'était guère possible d'employer le terme *antitoxique* car, consacré par un usage d'un demi-siècle, celui-ci s'applique presque exclusivement en microbiologie à la propriété *des antitoxines de neutraliser les toxines correspondantes*.

Nous ne croyons pas qu'il s'agisse d'une action vraiment diastasique, puisque ces substances *se différencient en particulier des enzymes* par le maintien de leur action après un chauffage à 125° pour les « *antidotes* » du *Bacille subtilis*, à 75° pour les filtrats de *Penicillium notatum et Streptomyces griseus*. En outre, ces antidotes peuvent agir encore à 20°, 15° et même à 4°. D'autre part, l'action antidotique des différents filtrats n'est pas modifiée lorsqu'on les additionne d'une certaine proportion de formol. En effet, les expériences effectuées par Richou et ses élèves avec les complexes antagonistes à base de *Subtiline, Pénicilline et Streptomycine*, ont permis de constater que ces complexes additionnés de 1/2 000e de formol et chauffés pendant 30 à 40 minutes jusqu'à 55° conservent leurs propriétés pendant plusieurs mois. D'autre part, ces auteurs ont pu constater que le pouvoir antidotique de ces complexes titré plusieurs années auparavant, était conservé pour la plupart d'entre eux.

Tous ces faits semblent indiquer *qu'il ne s'agit pas d'enzymes* et d'après les travaux antérieurs de J. Meyer, Burlet et Faudi (8) *il paraît beaucoup plus probable que ces substances sont à classer parmi les biostimulines*.

La *fonction antidotique* est d'autre part sans rapport avec la *fonction antibiotique*, comme Cavazzuti et Lepi (9) l'ont démontré. D'ailleurs, il est généralement admis et expérimentalement prouvé que ni *la Pénicilline, ni la Streptomycine*, telles qu'elles sont employées à l'état purifié, n'ont d'action appréciable sur les toxines microbiennes.

Richou et ses collaborateurs devaient se rendre compte du *caractère différentiel entre ces substances et les enzymes*, puisqu'ils contrôlent séparément les propriétés diastasiques des milieux de culture dans leur étude des substances antagonistes. Ils mentionnent que ces microbes élaborent des ferments proprement dits, dont la variété est très grande, tels que *des protéases, des nucléases, des lipases, des amylases, etc.*, ferments qui sont, eux aussi, absents dans les produits purifiés. Les *diastases protéolytiques* dans les divers complexes culturaux ont un grand intérêt pratique dans la thérapie et peuvent renforcer l'action des antibiotiques purs. Ainsi, Delaunay et Schlaepfer (10) ont montré

l'action remarquable exercée par un complexe cultural à base de Streptomycine sur les germes contenus dans l'expectoration de malades atteints de bronchite aiguë. Ces complexes antagonistes sont doués, grâce à leurs propriétés antibiotiques et enzymatiques, *d'un pouvoir bactéricide et bactériolytique* puissant vis-à-vis des germes contenus dans le produit pathologique examiné, en même temps qu'ils sont capables d'exercer une véritable lyse des cellules et des particules de fibrine, de protéines et de mucines qui s'y trouvent.

Richou et ses collaborateurs ont pu montrer *l'activité des complexes culturaux servant de base pour la préparation de la Streptomycine sur la flore microbienne contenue dans les crachats de sujets atteints de tuberculose pulmonaire chronique.* Malgré leur pouvoir antibiotique relativement peu élevé, grâce à leur pouvoir diastasique et à la véritable synergie qui s'établit entre leur pouvoir antibiotique et leur action antagoniste, peut-être aussi grâce à l'action antiseptique de traces de formol assurant la conservation, ces complexes culturaux ont une action antimicrobienne beaucoup plus marquée que *les solutions de Streptomycine pure.* Les substances antagonistes renfermant encore des doses relativement faibles de *Streptomycine*, ont une action thérapeutique beaucoup plus prononcée, puisque ces complexes agissent sur la flore microbienne commensale contenue dans les crachats, de sorte que la quantité relativement faible de *Streptomycine* peut exercer d'une façon spécifique son action antibiotique sur *le Bacille de Koch.*

Un caractère différentiel très marqué entre *ces complexes culturaux* d'un côté, *les enzymes et les antibiotiques* de l'autre côté, est la propriété virulicide des premiers. Ainsi, Remlinger et Bailly (11) ont constaté l'influence destructive qu'exercent « *in vitro* » les filtrats du *Bacille subtilis* sur le *virus de la rage.* Ramon et Richou (12) ont pu établir que des filtrats de culture de *Penicillium notatum* et de *Streptomyces griseus* sont doués d'un pouvoir inactivant à l'égard du *virus de la vaccine.* De même, les filtrats culturaux de *Bacille subtilis* et de *Streptomyces griseus* exercent « *in vitro* » un effet neutralisant sur le *virus de la nécrose du tabac* et détruisent le *virus aphteux* quand on les fait agir pendant 2 heures à la température de 36°.

Ce pouvoir virulicide des filtrats n'est notoirement pas dû aux propriétés antibiotiques et semble être le fait des *propriétés antidotiques ou biostimulantes*, problème qu'il nous a semblé intéressant d'élucider.

Dans le cadre de leurs travaux sur les *biostimulines*, J. Meyer, Burlet et Faudi ont déjà envisagé les caractères différentiels entre ces substances et les vitamines, fait que Faudi (13) a pu prouver expérimentalement. En ce qui concerne les complexes antagonistes, Povlotzkaya et Skorogotova (14) ont, les premiers, mis en évidence l'existence de certains principes vitaminiques dans ces filtrats. Par la suite, Rickers et ses collaborateurs (15) ont pu extraire des filtrats de *Streptomyces griseus* une substance cristalline qui présente les caractères chimiques et biologiques de la *Vitamine* B_{12}: cette vitamine est ainsi devenue un sous-

produit de la fabrication des antibiotiques. CARPENTIER (16) et d'autres auteurs américains ont montré que certains filtrats antibiotiques, tels que ceux provenant de la fabrication de *l'Auréomycine*, introduits *per os* dans l'organisme, ont un effet très net sur la croissance, effet supérieur à celui de toutes les vitamines. Ce fait renforce notre hypothèse quant à la présence de Biostimulines dans ces filtrats. Les liquides culturaux antagonistes, qui renferment sans doute d'autres principes que les vitamines et les enzymes, sont donc doués d'activités multiples qui justifient le terme de « *complexes antagonistes* ». Ce problème mérite d'être étudié, comme l'a également fait ressortir VELU (17) qui dit au sujet de ces complexes culturaux « *qu'ils constituent un aspect passionnant du problème des antibiotiques encore bien méconnu, si l'on en juge par le silence de la littérature médicale française, en dehors des travaux de* RAMON, RICHOU *et de leurs collaborateurs ainsi que de quelques vétérinaires d'après lesquels il semble désirable que des spécialistes reviennent à l'étude des complexes antagonistes et orientent leurs recherches futures vers l'isolement et la purification des principes antidotiques et enzymatiques qui, dans les filtrats de cultures, existent à côté des principes antibiotiques et se montrent capables de jouer un rôle non négligeable en thérapeutique, comme le soulignent les résultats très favorables obtenus grâce à l'utilisation de ces complexes en thérapeutique vétérinaire* ».

Nous avons cru intéressant d'orienter nos recherches vers les *Biostimulines animales et végétales*, qui semblent être beaucoup plus en cause que les enzymes dans ce problème, comme nous venons de le voir.

JAWETZ, GUNNISON et collaborateurs (18), après de nombreuses études d'associations d'antibiotiques, avaient proposé de ranger les antibiotiques en deux catégories: la première contiendrait les *antibiotiques essentiellement bactéricides*, comme la Pénicilline et la Streptomycine; la seconde l'Auréomycine, la Terramycine, le Chloramphénicol, etc., *qui seraient surtout bactériostatiques*, et ils émettent la règle schématique suivante :

« *On peut avec de bons résultats associer entre eux les antibiotiques appartenant à l'une ou à l'autre catégorie; mais il ne faut pas, de peur d'obtenir un effet antagoniste, associer un agent bactéricide à un agent bactériostatique.* »

Cette affirmation a été très discutée; en effet, comme le dit GASTINEL (19), si au bout de 48 heures, dans le cas par exemple de l'association « *in vitro* » *de Pénicilline et de Chloramphénicol*, un effet antagoniste est observé, ultérieurement par contre, on assiste dans le cas de cette association, à une stérilisation lente et presque complète, à l'inverse de ce qui se passe avec *la Pénicilline seule. Après un antagonisme à court terme s'installe une synergie très nette.*

Remarquons cependant que cette association Pénicilline + Chloramphénicol est constituée par deux antibiotiques de catégories différentes, puisque la Pénicilline fait partie des bactéricides et le Chloramphénicol est considéré comme agent bactériostatique.

Fasquelle croit qu'il est impossible de caractériser les antibiotiques seulement en envisageant l'antibiose « *in vitro* ». En effet, on peut dire que « *in vivo* » une association d'antibiotiques est généralement bénéfique et que l'antagonisme reconnu « *in vitro* » entre deux antibiotiques, l'action bactéricide de l'un étant supprimée par l'effet bactériostatique de l'autre, paraît pratiquement dépourvu d'effets nuisibles « *in vivo* ». Ce fait incite à penser que probablement ici encore c'est essentiellement l'action bactériostatique des antibiotiques qui est en jeu, complétée ensuite par la phagocytose.

Sans méconnaître l'intérêt, dans certains cas particuliers, de se servir de l'effet réellement *bactéricide* des antibiotiques isolés ou en association, on est donc conduit à l'idée qu'au fond, ce qui fait l'originalité du traitement antibiotique, c'est de disposer de produits essentiellement capables de déterminer *la bactériostase des microbes*.

CHAPITRE III

LES ANTIBIOTIQUES PROPREMENT DITS ET LEURS ANTAGONISTES

Pour éviter toute controverse, spécifions que nous envisageons dans ce chapitre les *antagonistes des sulfamides et des antibiotiques biologiques.*

Les sulfamides :

Dans le laboratoire de recherches de la *I.G. Farben* (*Allemagne*) deux chimistes, Mietsch et Klarer, travaillant systématiquement, ont synthétisé un grand nombre de corps contenant le *groupe azoïque :* —N=N—. Ce noyau constitue l'élément essentiel des sulfamides qui sont des *amides d'un Acide sulfonique.* Domagk a essayé l'efficacité de ces corps azoïques dans le traitement des infections bactériennes. En 1932, il a constaté qu'un de ces corps, le *Prontosil rouge*, guérissait les souris infectées par le *Streptocoque hémolytique.* De 1932 à 1935, on a essayé le *Prontosil* dans différentes cliniques et le 15 février 1935, Domagk a publié le résultat de ses recherches, dont il a déduit l'efficacité clinique du *Prontosil* dans un certain nombre de maladies occasionnées par des *Streptocoques hémolytiques* (érysipèle, fièvre de Malte, septicémie, etc.).

La découverte de Domagk signifie un grand progrès en chimiothérapie. Après la découverte du *Salvarsan* par Ehrlich, les deux auteurs ont créé le début d'une ère nouvelle et féconde dans le traitement des infections bactériennes, *l'ère de la sulfamidothérapie.* Si nous analysons la formule du *Prontosil* nous voyons qu'il renferme un groupe benzénique avec la fonction sulfonamide : $—SO_2NH_2$ uni par un chaînon —N=N— (caractéristique du colorant azoïque) à un autre groupe benzénique avec deux fonctions amine.

En décembre 1935, les époux Trefouël du *Laboratoire de Chimie Thérapeutique de l'Institut Pasteur*, avec leurs collaborateurs Nitti et Beauvais, ont démontré que l'activité du *Prontosil* n'était pas due à son groupe azoïque, mais que dans l'organisme, cette molécule se divisait mettant en liberté la *Para-amino-benzénosulfamide* qui est en réalité le groupe actif du *Prontosil.*

La découverte des chercheurs français a été d'un grand intérêt, puisqu'il s'agit d'un corps facile à préparer synthétiquement, soluble dans l'eau et actif sur les bactéries dans les milieux de culture artificiels,

tandis que *le Prontosil* est beaucoup plus difficile à fabriquer, il est quasi insoluble dans l'eau et, de plus, inactif « *in vitro* ».

Par la suite, Ewins et Philipps ont synthétisé la *Sulfonamidopyridine*, commercialisée sous les noms de *Pyridazol* ou *Dagenan*, active contre les *Pneumocoques* principalement. Ont apparu ensuite : le *Sulfathiazol*, le *Cibazol* et la *Thiazomide*, agissant surtout contre les *Staphylocoques*. La *Sulfadiazine*, la *Sulfanilguanidine* et le *Succinylsulfathiazol* ont ensuite été élaborés pour lutter contre les infections par les *entéro-bactéries Gram-négatives, telles que fièvre typhoïde et dysenterie.*

Mécanisme de l'action des sulfamides et bases scientifiques d'une chimiothérapie rationnelle :

Les antiseptiques classiques sont des poisons protoplasmiques qui paralysent totalement et définitivement les processus vitaux et tuent les bactéries. *Les sulfamides* ne paralysent pas totalement les processus métaboliques bactériens; ils interviennent dans la chaîne des réactions enzymatiques liées à la prolifération cellulaire. C'est en cela que consiste leur action bactériostatique : *ils empêchent la multiplication des bactéries.* Si l'on peut maintenir bloquée la prolifération bactérienne durant un certain temps, les processus de défense naturelle de l'individu traité se chargent de détruire les bactéries pathogènes. Il faut noter que les sulfamides ne neutralisent jamais les toxines bactériennes. *Quand les germes responsables d'une infection sont sensibles aux sulfamides qu'on leur oppose, et que les processus de défense de l'organisme sont actifs, on peut s'attendre à une réponse rapide et favorable au traitement.*

Chez les bactéries soumises *aux sulfamides* les processus métaboliques ne sont pas totalement abolis. Parfois même, les bactéries croissent anormalement et des formes géantes apparaissent. Ce qui est supprimé, c'est leur faculté de proliférer : *la division cellulaire est bloquée.* Par quel mécanisme ? L'action porte sur une étape anabolique que nous ne connaissons pas encore. Peut-être agissent-ils sur des réactions enzymatiques principalement liées à la synthèse *des Nucléines*, et la masse nucléaire n'augmentant plus, elle ne parviendrait pas à équilibrer le rapport nucléo-plasmatique nécessaire à la division cellulaire.

Dans les milieux de culture artificiels, les bactéries inhibées par les *sulfamides* ne sont pas mortes. Elles peuvent retrouver leur capacité de proliférer si l'on neutralise dans le milieu de culture *les sulfamides* avec des substances opposées à leur action : *les antisulfamides.* Il est clair que si l'action bactériostatique dans les milieux de culture dure longtemps, ces bactéries affaiblies à cause de leur métabolisme précaire et incapables de proliférer, finissent par mourir.

Les processus vitaux sont le résultat d'une chaîne complexe de réactions enzymatiques qui se déroulent successivement. La rupture de la chaîne, si elle est momentanée ou de courte durée, paralyse la vie cellulaire, mais si cette action dure un certain temps, survient l'écroulement des systèmes fermentatifs ou, autrement dit, la mort.

Lockwood (20) observa que les peptones inhibent ou atténuent l'action bactériostatique des *sulfamides*. Stamp et Green ont démontré que l'on peut extraire des *Streptocoques* et d'autres bactéries des substances antagonistes à l'égard de l'action des *sulfamides*.

En 1940, Woods (21) en travaillant avec des *Streptocoques*, a observé que *l'Acide para-aminobenzoïque* est un antagoniste spécifique de l'action bactériostatique qu'exerce le sulfamide sur ces germes. C'est-à-dire que *si, à une culture de Streptocoques inhibée par le Sulfanilamide, nous ajoutons de l'Acide para-aminobenzoïque, les microbes recommencent à proliférer.*

Comme *l'Acide para-aminobenzoïque* est un facteur de croissance du Streptocoque et de nombreux autres microbes, Woods, interprétant l'action du *Sulfanilamide*, a estimé que ce remède s'oppose à l'utilisation normale de *l'Acide para-aminobenzoïque*, qui est un métabolite essentiel pour ces germes.

Fildes (22), travaillant parallèlement à Woods, a constaté aussi cette action antagoniste de l'Acide para-aminobenzoïque et du Sulfanilamide, et interprète l'action de celui-ci comme étant un blocage de l'Acide para-aminobenzoïque, qui est un coferment essentiel d'un système enzymatique catalysant certaines réactions essentielles étroitement liées avec la reproduction bactérienne. Le Sulfanilamide et ses dérivés substitués (Sulfapyridine, Sulfathiazol, etc.) agissent *en empêchant les bactéries d'utiliser l'Acide para-aminobenzoïque*. Si nous comparons les formules de l'Acide para-aminobenzoïque et du Sulfanilamide nous voyons qu'elles sont très semblables, la différence étant simplement que le groupe COOH de l'Acide para-aminobenzoïque est remplacé dans le Sulfanilamide par le groupe SO_2NH_2.

En admettant que l'Acide para-aminobenzoïque agit en tant que coferment pour compléter le système enzymatique auquel est liée la prolifération bactérienne, quand nous donnons à un malade un sulfamidé en quantité plus que suffisante pour neutraliser l'Acide para-aminobenzoïque des liquides de l'organisme atteint, les bactéries habituées à utiliser l'Acide para-aminobenzoïque s'emparent des molécules du sulfamide dont la structure est très semblable à celle de leur métabolite essentiel; c'est là leur perte, parce que les molécules de sulfamide, ne permettant pas de compléter le système enzymatique qui régit la prolifération, leur nombre n'augmente pas, elles sont affaiblies à cause de leur métabolisme atténué et à la merci des mécanismes normaux de défense de l'organisme, ce qui détermine la guérison.

Schématiquement, nous représentons ainsi l'action de l'Acide para-aminobenzoïque et du Sulfanilamide :

Apoferment + Acide para-aminobenzoïque (coferment) — Holoferment qui conditionne la croissance microbienne = Prolifération bactérienne = *Infection*

Apoferment + Sulfamide = Pas de production d'holoferment = Pas de prolifération = Mort des germes = *Guérison*

Cependant, cet apoferment a beaucoup plus d'affinité pour l'Acide para-aminobenzoïque que pour les sulfamidés, c'est pourquoi ceux-ci doivent être employés à une grande concentration.

Les quantités d'Acide para-aminobenzoïque qui peuvent neutraliser un poids donné de Sulfamide varient selon les conditions d'expérience, la nature du germe, le pH, etc.

On estime qu'une partie d'Acide para-aminobenzoïque neutralise 1 600 parties de Sulfanilamide, 100 parties de Sulfapyridine, 36 parties de Sulfathiazol, 100 parties de Sulfadiazine et 1 000 parties de Sulfaguanidine.

Il faut se rappeler que les produits d'hydrolyse des protéines (Peptones, Polypeptides, Méthionine, etc.) ont une action antagoniste à l'égard des sulfamides. Ainsi s'explique que les Sulfanilamides appliqués sur des zones purulentes ou nécrotiques ont peu d'activité. On a mis également en évidence dans le muscle frais, dans la rate, dans le pancréas et dans les liquides pleuraux, péricardiques et synoviaux, des substances qui s'opposent à l'action des sulfamides, et on estime qu'il en est de même « *in vivo* ».

En plus de l'Acide para-aminobenzoïque, d'autres corps chimiques contenant ce groupe peuvent agir comme des antisulfamidés, quoique avec une activité moindre. Ainsi la *Novocaïne*, qui est l'Ester para-aminobenzoïque du Diéthylamino-éthanol, possède une action antisulfamide et par là, quand on emploie la Novocaïne en anesthésie locale et qu'on applique simultanément des sulfamidés dans la même région, l'action de ces derniers peut être extraordinairement affaiblie.

Le fait important à retenir est que *l'action des sulfamides est en rapport avec l'interaction d'un métabolite essentiel, l'Acide para-aminobenzoïque*, même si nous ne connaissons pas la nature exacte des réactions enzymatiques qui sont paralysées.

Il est évident que les bases scientifiques d'une chimiothérapie rationnelle doivent être assises sur la connaissance des processus par lesquels un agent antimicrobien agit « *in vivo* » en présence des tissus et des liquides de l'organisme malade. Le grand mérite de l'école de Fildes a été d'expliquer le mécanisme d'action des sulfamides comme une intervention dans l'utilisation d'un métabolite essentiel pour la prolifération bactérienne.

Mac Ilwain (23) a réalisé des travaux d'un grand intérêt dans le *Laboratoire de Chimie Bactériologique de l'Université de Sheffield*. En 1940, il découvrit que *l'Acide pyridine-3-sulfonique ou son amide* inhibent la croissance des bactéries qui ont besoin de *l'Acide nicotinique* pour leur

développement, et que cette action de l'Acide pyridine-3-sulfonique peut être neutralisée en ajoutant au milieu de culture une plus grande quantité d'acide nicotinique ou de son amide. En 1941, il observa l'effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire des *Acides α-aminosulfoniques*, vis-à-vis de l'action stimulante de quelques *α-aminoacides* (Glycocolle, Alanine, etc). Une action secondaire intéressante de quelques sulfamides réside dans leur intervention au cours de la réaction enzymatique catalysée par l'*anhydrase carbonique*, ferment qui règle la réaction réversible :

$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows CO_3H_2$$

L'anhydrase carbonique est une *Zinc-protéine* qui remplit une mission importante dans le transport du CO_2 par le sang et qui intervient dans la régularisation de l'équilibre acide-base de l'organisme.

Meldrum et Roughton (24) qui ont découvert ce ferment, furent les premiers à émettre l'hypothèse qu'il pourrait remplir une certaine fonction dans la formation de la coquille des œufs des oiseaux, en modifiant la rapidité de la formation de l'anion de CO_3Ca.

Keilin et Mann (25) ont démontré que certaines combinaisons du type $R\text{-}SO_2$ (R étant un noyau benzénique, naphtalénique ou pyridinique) inhibent à petite concentration l'Anhydrase carbonique, en diminuant le pouvoir de combinaison du CO_2 du sang.

On a observé que 2 ou 3 g de sulfanilamide par jour inhibent ce ferment suffisamment pour freiner l'excrétion du CO_2 par les poumons d'individus normaux effectuant un travail, bien que leur effet ne soit pas appréciable chez les sujets au repos.

Common (26), recherchant la productivité en *Anhydrase carbonique* des tissus de l'oviducte de la poule, constate qu'elle est très intense et qu'ainsi l'hypothèse de Meldrum et Roughton est vraisemblable. En outre, comme le Sulfanilamide inhibe l'Anhydrase carbonique purifiée, on pensa à donner aux poules le Sulfanilamide par voie orale, pour voir ce qui arriverait aux œufs, et l'on constata qu'ils étaient pondus sans coquille, preuve de l'inhibition par le Sulfanilamide du ferment qui intervient dans la formation du Carbonate de calcium.

Si, au lieu de *Sulfanilamide*, on donne aux poules de la *Sulfapyridine* ou du *Sulfathiazol*, les œufs pondus sont normaux, c'est-à-dire que l'action sur le ferment exige que le groupe SO_2NH_2 soit intact; en revanche, on observe que des corps tels que l'Acétylsulfanilamide (sans action bactériostatique parce que son groupe NH_2 est bloqué en position para par rapport au SO_2NH_2) empêchent aussi la formation du Carbonate de chaux chez les poules. C'est donc bien le groupe SO_2NH_2 qui agit sur l'anhydrase carbonique.

Iwanovics (27) a découvert en 1942 un fait intéressant : *l'Acide pantothénique inhibe « in vitro » l'action bactériostatique de l'Acide salicylique.* On sait que celui-ci s'emploie pour la préparation de conserves et on peut expliquer son rôle antiseptique par son action sur l'Acide panto-

thénique (facteur de croissance pour les bactéries). C'est dans ce sens qu'on peut se demander, comme l'a exposé Obdulio Fernandez en avril 1944, *si l'efficacité des Salicylates dans les rhumatismes polyarticulaires aigus ne serait pas due à ce que l'ion salicylique bloquerait l'Acide pantothénique indispensable au développement du Streptocoque, responsable de cette maladie.*

Mac Ilwain et Hawkin (28), dans leurs expériences sur le *Streptocoque hémolytique*, ont observé qu'en ajoutant aux cultures de la *Pantoyltaurine* à des concentrations 200 fois plus fortes que celles du Pantothénate, le germe ne croissait pas. Sur ces données, ils ont entrepris des expériences chez l'animal et ont observé que la Pantoyltaurine est efficace quand on l'administre aux rats qu'elle protège contre une infection par des souches virulentes de *Streptocoques;* en revanche, ils échouèrent dans les essais qu'ils firent pour protéger des souris, celles-ci ayant une concentration sanguine de *Pantothénate* supérieure à celle des rats. C'est dire que chez les rats, la concentration de *pantothénate* dans le sang était suffisamment basse pour que les doses de *Pantoyltaurine* utilisées par Mac Ilwain fussent suffisantes pour maintenir un rapport *Pantoyltaurine / Pantothénate* assez élevé et obtenir ainsi la *bactériostase*. De ces travaux dérivent peut-être des applications à la thérapeutique, car la concentration de Pantothénate dans le sang humain est encore légèrement inférieure à celle du sang des rats et on aurait besoin, dans le cas de l'homme, de doses proportionnellement plus basses de *Pantoyltaurine* pour obtenir un effet thérapeutique.

Si nous examinons ces quatre agents bactériostatiques : *Sulfanilamide. Acide pyridine-3-sulfonique. Acide α-aminosulfonique* et *Pantoyltaurine*, nous voyons que le groupe COOH des facteurs de croissance correspondant à chacun de ces quatre corps est remplacé chez eux par le groupe sulfonique SO_2OH (ou par SO_2NH_2 dans le cas du Sulfanilamide).

En 1943, on a étudié l'action inhibitrice de la *Pyrithiamine* vis-à-vis de l'action stimulante exercée sur la croissance de diverses bactéries par l'*Aneurine*. La *Pyrithiamine* a la structure chimique de la *Vitamine* B_1 ou *Aneurine*, mais au lieu du groupe thiazolique elle possède un noyau pyridinique.

Wyss (29), dans ses expériences sur le *Staphylocoque doré*, a dû employer la *Pyrithiamine* à une concentration 700 fois plus forte que celle de la Vitamine B_1 pour obtenir l'inhibition. L'action de la *Pyrithiamine* peut être neutralisée par une nouvelle addition de Vitamine B_1 au milieu de culture.

Le travail sur les antibiotiques de Dittmer et Du Vigneaud (30) prouve que le dérivé sulfoné de la *Biotine* inhibe la croissance de *Lactobacillus casei, L. arabinosus et Staphylococcus aureus.*

Tous ces travaux montrent que l'orientation de Fildes et de Mac Ilwain peut conduire à la découverte de nouveaux agents bactériostatiques, en rapport avec les facteurs de croissance et de prolifération bactérienne. Mais il n'est pas indispensable, pour freiner l'activité

pathogène d'une bactérie, d'agir sur ses métabolites. Dubos (31) dit *qu'il suffit de s'attaquer à certains composants ou à certains produits cellulaires, essentiellement responsables du pouvoir pathogène ;* il démontre expérimentalement qu'en cultivant certains microbes du sol sur des milieux dans lesquels le seul aliment énergétique est constitué par des polysaccharides spécifiques des capsules d'un Pneumocoque déterminé, on oblige ces bactéries du sol à élaborer des ferments spécifiques vis-à-vis des polysaccharides employés, et qu'en appliquant ces ferments aux animaux inoculés avec des *Pneumocoques*, dont le polysaccharide capsulaire est du même type que celui ajouté au milieu de culture, les capsules de ce *Pneumocoque* virulent sont digérées et les germes ainsi dénudés perdent leur virulence et succombent à la phagocytose et aux autres défenses de l'organisme, grâce à quoi on peut protéger de l'infection les animaux traités. Nous voyons là une nouvelle route à suivre dans la lutte anti-infectieuse.

Les antibiotiques :

Nous résumons la question de l'antagonisme entre médications antibactériennes d'après le travail de Manten et Wisse (32).

Quand deux antibiotiques sont associés, on sait que de leur combinaison résulte un effet antibactérien additif, synergique ou antagoniste.

Les auteurs ont repris l'étude de ces antagonismes en choisissant comme critère de puissance antibactérienne l'action bactéricide et en se basant non pas sur le diamètre des zones d'inhibition, mais sur le nombre de colonies. Ces expériences sont réalisées avec des souches de *Staphylocoques, d'Entérocoques, de Salmonella et de Colibacilles.*

Dans le schéma suivant, les antibiotiques sont classés en bactéricides (groupes 1 et 2) et en bactériostatiques (groupes 3 et 4).

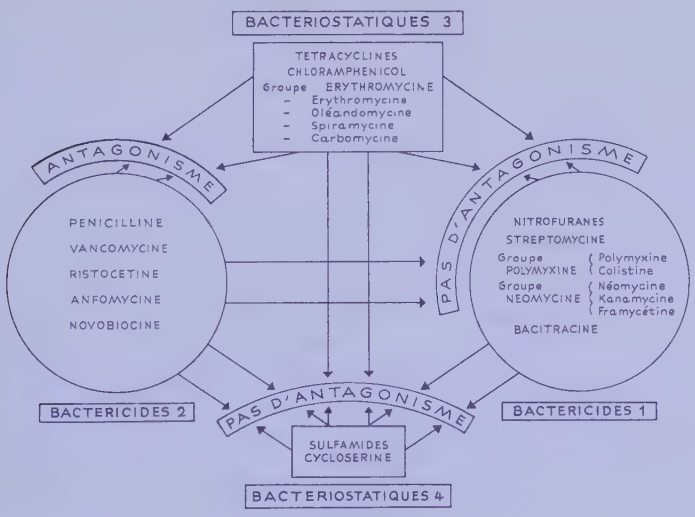

Fig. 1

Les substances appartenant à un même groupe peuvent être combinées l'une avec l'autre sans aucun risque d'antagonisme, comme nous l'avons déjà vu.

L'antagonisme est rarement rencontré entre les substances du groupe 1 et celles des groupes 2, 3 et 4; dans ce cas, l'agent bactéricide prédomine fortement, il y a fréquemment synergie, notamment avec les associations *Streptomycine-Pénicilline*, *Kanamycine-Pénicilline*, *Polymyxine-Chloramphénicol*.

Quand on associe un bactéricide du groupe 2 et un bactériostatique du groupe 3, l'antibiotique le plus faible (bactériostatique) domine et il y a antagonisme.

En combinant les substances des groupes 2 et 4, il n'apparaît pas d'antagonisme; l'antibiotique bactéricide domine et il y a parfois synergie (*Pénicilline-sulfamides*).

Le comportement des deux groupes de bactéricides s'explique par leur mode d'action différent. Par exemple, la Pénicilline ne détruisant les bactéries qu'en période de croissance, les antibiotiques du groupe 3 (bactériostatiques) rendent la Pénicilline inefficace.

Par contre, les sulfamides et les Cyclosérines, bien que bactériostatiques, ne neutralisent pas la Pénicilline, parce qu'il faut attendre quelques heures avant que ne se manifestent leurs effets; dans l'intervalle la Pénicilline a le temps d'agir.

L'efficacité des bactéricides du groupe 1, dont l'action n'est pas liée à la croissance des bactéries, n'est pas modifiée par les bactériostatiques des groupes 3 et 4.

Quand il s'agit du *Staphylocoque*, l'antagonisme entre la *Pénicilline* d'une part et le *Chloramphénicol*, la *Tétracycline* et l'*Érythromycine* d'autre part, se manifeste sur une large gamme de concentrations. L'antagonisme n'atteint que *l'activité bactéricide de la Pénicilline*, les faibles effets bactéricides des antibiotiques de l'autre groupe restent inchangés; c'est un antagonisme strictement unilatéral.

Connaissant les effets synergiques ou antagonistes entre les différents sulfamides d'une part et entre les antibiotiques biologiques d'autre part, il nous a semblé intéressant d'étudier plus en détail ces problèmes.

Un autre fait a attiré notre attention : poursuivant les travaux de Faudi et de Illien (33) sur *les Biostimulines animales et végétales, sur les Stimulines de Filatov, nous avons étudié l'influence de ces facteurs sur l'activité des antibiotiques biologiques ou synthétiques*, qui pourrait se traduire par un effet frénateur ou stimulant. Nos travaux étaient grandement facilités par une technique permettant le dosage des *Biostimulines* par la bactérie-test *Zymomonas mobile, Lindner*. Nous avons donc pensé pouvoir contrôler l'influence des ces facteurs de croissance sur les produits antimicrobiens. En effet, on peut supposer que les *Biosti-*

mulines renforcent l'activité antibiotique de la *Pénicilline*, par exemple, par leur action stimulante sur la croissance des bactéries pénicillino-sensibles telles que les *Staphylocoques*. Ceci parce que les *Biostimulines* favorisent la multiplication des germes et que la *Pénicilline* et les antibiotiques du même genre agissent essentiellement dans la phase de croissance des bactéries.

D'autres bactéries, comme les *Colibacilles* par exemple, sont inhibées par des antibiotiques tels que la *Streptomycine*, à cause de modifications de leur matériau somatique. Dans ce cas, on peut supposer que les *Biostimulines* n'ont aucune action sur l'activité de l'antibiotique, s'il n'augmente pas son effet.

Le problème de *l'influence des Biostimulines sur la synergie ou l'antagonisme entre les divers sulfamides, antibiotiques biologiques et leur mélange* vaut également la peine d'être étudié.

Il y aurait également lieu d'étudier l'influence des *Biostimulines sur des souches bactériennes ayant acquis une résistance* à l'un ou l'autre antibiotique ou à leur association. *Les Biostimulines* favorisant, comme nous l'avons vu, la multiplication des germes, on peut supposer que les générations se succédant plus rapidement, on pourrait retrouver plus rapidement des souches sensibles aux antibiotiques en question.

Dans nos travaux personnels, nous allons envisager quelques-uns de ces divers problèmes.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE IV

DOSAGE DES ANTIBIOTIQUES ET SULFAMIDES

Dosage de la Pénicilline :

Nous prenons comme exemple le dosage de l'activité d'une solution aqueuse de *Pénicilline G pure*, exempte de protéines. Comme milieu de culture, nous avons employé le *Bacto Penassay Broth Difco*, qui a la composition suivante :

Bacto-Beef Extract	1,5 g
Bacto-Yeast Extract	1,5 g
Bacto-Peptone	5,0 g
Bacto-Dextrose	1,0 g
Sodium chloride	3,5 g
Dipotassium phosphate	3,68 g
Monopotassium phosphate	1,32 g
Eau distillée q.s.p.	1 000,00 ml

Comme bactérie-test, nous avons utilisé une suspension de spores de *Bacille subtilis souche ATCC* 6633. La sensibilité de cette souche vis-à-vis de *la Pénicilline et de la Streptomycine* est très marquée; l'inoculat est dilué de façon à ce qu'il renferme environ 10 000 spores /ml.

La solution de *Pénicilline G pure* à tester est préparée à l'aide d'un tampon phosphaté à pH = 6,5. P. Klein (34) indique les avantages suivants pour l'utilisation d'une suspension de spores :

1) La suspension peut être conservée à —20° pendant plusieurs années, répartie en petites doses. Dans ces conditions, on travaille avec une souche toujours identique, de même concentration et l'inoculat est disponible à tout moment.

2) Les bactéries sporulées sont en général peu exigeantes et se développent aussi bien en milieu semi-synthétique (hydrolysat de caséine) qu'en milieu usuel en microbiologie.

3) La suspension de spores possède dans les méthodes de dilution une activité inhibitrice de 0,01 à 0,02 U/ml de Pénicilline et ceci indépendamment de l'importance de l'inoculat.

4) Les cellules de cette souche sont à peu près homogènes au point de vue de leur sensibilité individuelle.

5) On évite les repiquages systématiques pour l'entretien de la souche.

Comme inconvénients, l'auteur cite la thermorésistance de ces spores qui demandent un chauffage à 160° pour leur stérilisation; puis le risque d'infection du laboratoire. Nous voudrions attirer l'attention sur un autre fait : le Bacille subtilis pousse facilement en voile à la surface du milieu liquide. Pour l'opacimétrie il faut donc une agitation constante et énergique.

On prépare des gammes de tubes de milieu liquide contenant des doses décroissantes d'antibiotique; on ensemence avec la suspension de spores; on dispose à l'étuve à 30° et on procède à la lecture macroscopique ou au moyen de la cellule photoélectrique. Le dernier tube où il n'y a pas eu de croissance contient la dose minimale capable d'inhiber le développement microbien. Connaissant la concentration en antibiotique du contenu de ce tube, on en déduit la sensibilité du germe.

On prépare deux solutions d'antibiotique contenant : Solution A = 10 U/ml et Solution B = 1/16e de la solution A. Nous donnons la marche de l'expérience dans les tableaux suivants :

TABLEAU N° 1

Gamme N° 1

Réactifs	Quantité en ml								
	Tubes N°								
	1	2	3	4	5	6	7	8	Témoin
Eau distillée	0,0	4,0	6,0	7,0	0,0	4,0	6,0	7,0	8,0
Pénicilline									
Solution A	8,0	4,0	2,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Solution B	0,0	0,0	0,0	0,0	8,0	4,0	2,0	1,0	0,0
Milieu ensemencé	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	
Concentration de Pénicilline en U/ml	5,0	2,5	1,25	0,6	0,3	0,15	0,075	0,037	

TABLEAU N° 2

Gamme N° 2

Réactifs	Quantité en ml							
	Tubes N°							
	1	2	3	4	5	6	7	Témoin
Eau distillée	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	10,0
Sol. Pénicilline	10,0	9,0	8,0	7,0	6,0	5,0	4,0	0,0
Milieu ensemencé	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Dilution :	1/2	1/2,2	1/2,5	1/2,8	1/3,3	1/4	1/5	

La gamme N° 1 est assez lâche et ne permet qu'un dégrossissement, tandis que la gamme N° 2 permet d'obtenir des résultats plus précis en partant du taux de sensibilité indiqué par la gamme N° 1.

EXEMPLE :

Dans la gamme N° 1 on observe que dans le tube N° 5 il n'y a pas de culture, alors que dans le tube N° 6 il y a un développement. Ceci indique que le germe est sensible à 0,3 U de Pénicilline. Le tube N° 5 correspond à la solution A à 1/32. Nous ferons donc *la gamme* N° 2 en partant de la solution A diluée au 1/16e.

TABLEAU N° 3

Réactifs	Quantité en ml							
	Tubes N°							
	1	2	3	4	5	6	7	Témoin
Eau distillée	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	10,0
Pénicilline Sol. A 1/16e	10,0	9,0	8,0	7,0	6,0	5,0	4,0	0,0
Milieu ensemencé	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Dilutions	1/32	1/35,2	1/40	1/45	1/52,8	1/64	1/80	
Concentration en Pénicilline	0,3	0,28	0,25	0,22	0,19	0,15	0,12	
Culture	—	—	—	+	+	+	+	+

Le germe en question est donc sensible à 0,25 U/ml de Pénicilline.

Dosage du Chloramphénicol :

Pour le dosage du *Chloramphénicol*, nous avons employé les milieux de culture suivants :

Milieu I :	Peptone bactériologique	5,0 g
	Extrait de viande	1,5 g
	Autolysat de levure de panification	3,0 g
	Chlorure de sodium officinal	3,5 g
	Glucose officinal	1,0 g
	Phosphate monopotassique	1,3 g
	Phosphate bipotassique	3,7 g
	Eau distillés q.s.p.	1 000,0 ml

Répartir en fioles coniques contenant 100 à 200 ml de milieu, stériliser à l'autoclave à 115° pendant 20 minutes.

Milieu II :	Peptone bactériologique	6,0 g
	Extrait de viande	2,0 g
	Extrait aminé de caséine et levure	4,0 g
	Glucose	1,0 g
	Gélose	2,0 g
	Eau distillée q.s.p.	1 000,0 ml

Ajuster le pH à 7,0 — 7,2 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium à 10 %. Répartir le milieu en fioles de Roux et en tubes à essai, stériliser le tout à l'autoclave à 115° pendant 20 minutes, puis laisser refroidir les tubes en position inclinée.

Préparation de la culture de germe-test :

On utilise comme germe-test une souche de *Sarcina lutea PCI* 1001 que l'on entretient par réensemencements successifs sur le milieu gélosé II à 27°.

On part d'une culture-mère âgée de 15 jours au plus, pour ensemencer quelques tubes du milieu N° 1. On met les germes de ces cultures, âgés de 24 heures, en suspension dans 6 ml d'eau distillée, en raclant précautionneusement la surface du milieu. On prélève ensuite 5 ml de cette suspension pour ensemencer le milieu gélosé II en fioles de Roux de 1 litre et on cultive pendant 18 heures à 37°. On introduit à ce moment 25 ml d'eau distillée stérile, on agite soigneusement et on transvase aseptiquement la suspension bacillaire dans une fiole stérile de 50 ml. On prélève 5 ml de cette suspension et on les introduit dans un tube calibré de 1 cm de diamètre, puis on ajuste avec de l'eau distillée exactement mesurée jusqu'à une transmission de 40 % déterminée à l'électrophotomètre muni d'un filtre de 640 mμ et par rapport à un témoin d'eau distillée donnant 100 % de transmission.

Sachant la quantité d'eau distillée introduite dans 5 ml de suspension bactérienne pour ajuster à 40 % de lumière transmise, on calcule la dose d'eau distillée nécessaire pour ramener les 20 ml de suspension bactérienne au même taux.

On mélange soigneusement et on introduit 1 ml de cette suspension dans la gamme de tubes contenant 9 ml de milieu liquide N° 1 destiné au dosage du Chloramphénicol.

Préparation des dilutions de Chloramphénicol :

On prépare une solution-mère de *Chloramphénicol* de 1 000 γ/ml en employant comme solvant le tampon phosphaté de pH = 7,4 et de composition suivante :

Solution N/5 de phosphate acide de potassium PO_2H_2K à 27,231 g pour 1 000 ml	50,0 ml
Solution N/5 de NaOH	39,5 ml
Eau distillée q.s.p.	200,0 ml

On dilue dans ce tampon la solution-mère de Chloramphénicol de façon à obtenir une gamme de 40 — 60 — 80 — 100 γ/ml.

On répartit d'autre part, dans 4 tubes à fond plat calibrés et stériles, 1 ml de chacune des dilutions de *Chloramphénicol* ci-dessus, puis on introduit dans chaque tube 9 ml de milieu liquide N° 1 ensemencé par la souche de bactérie-test. On agite et porte à l'étuve à 37° pendant 3 heures 30.

En même temps, on prépare un tube témoin, dans lequel l'antibiotique a été remplacé par 1 ml d'eau distillée. Ce tube doit indiquer après 3 heures 30 une transmission voisine de 40 %, mesurés également avec le filtre vert de 640 mμ.

On retire de l'étuve et on introduit dans chaque tube une goutte de soluté officinal de formol. On règle l'électrophotomètre de façon à ce qu'il indique 100 % de transmission avec de l'eau distillée. On procède alors à la mesure successive de la transmission du contenu de chacun des tubes. Le tube témoin ensemencé, mais dépourvu d'antibiotique indique environ 40 % de transmission. On établit la valeur moyenne des transmissions obtenues pour chaque concentration en antibiotique. Les résultats obtenus permettent de tracer sur du papier millimétrique la courbe-étalon, en portant pour chaque tube la concentration exprimée en γ de *Chloramphénicol* sur l'échelle logarithmique en abscisse et la moyenne de pourcentage de lumière transmise sur l'échelle arithmétique en ordonnée.

Au cours des expériences, on peut alors se rapporter à la courbe étalon pour déterminer l'activité antibiotique correspondant à la transmission trouvée proportionnelle à l'action inhibitrice de la dose de *Chloramphénicol* mise à l'épreuve.

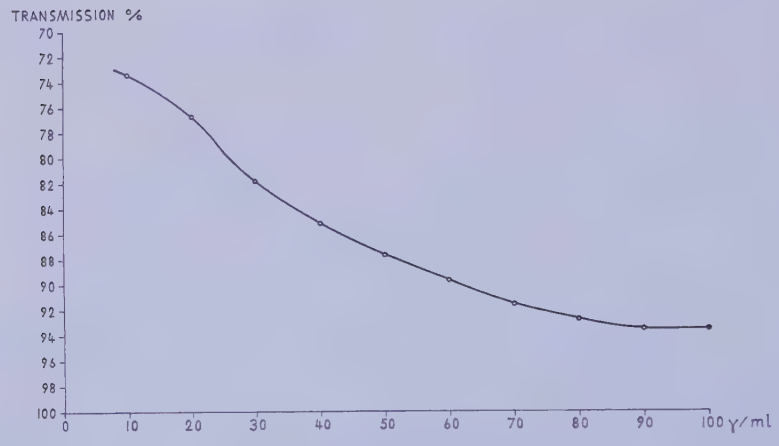

Fig. 2

Courbe-étalon Chloramphénicol

Les autres antibiotiques ont été dosés de la même façon, en utilisant pour la *Streptomycine* comme germe-test *Bacillus subtilis*, pour l'Auréomycine ainsi que pour tout le groupe des Tétracyclines : *Sarcina lutea PCI* 1001.

Dosage des Sulfamides :

Dans les mélanges d'*antibiotiques et de sulfamides*, nous avons dosé l'activité antimicrobienne totale par voie biologique, comme nous venons de le voir, puis *les sulfamides* par voie chimique.

Connaissant alors le taux de sulfamide on peut, par l'étude des courbes d'activité du mélange antibiotique + sulfamide, déduire l'activité antibactérienne de l'antibiotique seul dans l'association en étude.

Pour le dosage *des sulfamides*, nous avons d'abord eu recours à la méthode modifiée de la *Pharmacopée Internationale* (Édition 1, volume 1) ; d'après cette méthode, on dissout environ 500 mg exactement pesés de *sulfamide* dans 75 ml d'eau et 10 ml d'Acide chlorhydrique à 25 % ; on refroidit la solution à environ 15° et on titre au moyen d'une solution de Nitrite de sodium N /10, en présence d'empois d'amidon iodé [réactif de chlorure de zinc iodé (R)]. Les dérivés *de sulfamides substitués* à un groupe aminé aromatique, tel que le *Succinyl-sulfathiazol*, doivent être bouillis en présence d'Acide chlorhydrique avant le dosage. Cette méthode ne nous a pas semblé assez précise dans le cadre de notre travail, et nous avons finalement eu recours à la technique de MARSHALL modifiée par MARTIN.

Principe :

Diazotation de la fonction amine libre du *sulfamide*. L'Acide nitreux forme un diazoïque qui est couplé soit avec la *diméthyl-α-naphtylamine*, soit avec un *phénol en solution alcaline*. On obtient ainsi un colorant rouge plus ou moins intense suivant le taux de *sulfamide*. On dose le *sulfamide* par comparaison de la teinte obtenue avec une échelle étalon de titre connu.

Matériel nécessaire :

1) *Solution fraîchement préparée de Nitrite de sodium :*

Nitrite de sodium	0,10 g
Eau distillée	100,00 ml

2) *Solution de diméthyl-α-naphtylamine :*

Diméthyl-α-naphtylamine	1,0 g
Alcool à 96°	125,0 ml
Acétone	125,0 ml

3) *Solution titrée de sulfamide :*

a) *Solution-mère :*

Para-amino-phénylsulfamide (Sulfanilamide)	0,02 g
Eau distillée	100,0 ml

On chauffe modérément jusqu'à dissolution et on conserve dans un endroit frais. Cette solution-mère nous a servi à la préparation d'une solution diluée à 0,01 g %, qui doit être faite au moment de l'emploi.

b) *Solution titrée diluée :*

Solution-mère de Sulfamide	5,0 ml
Eau distillée q.s.p.	100,0 ml

4) *Solution d'Acide trichloracétique à* 50 %.

Préparation de la gamme-étalon :

Préparer 8 tubes à essais d'un même calibre, introduire dans ces tubes les réactifs suivants :

TABLEAU N° 4

Réactifs en ml	Tubes N°							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Sol. diluée de sulfamide	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	6,0	8,0	10,0
Eau distillée	9,5	9,0	8,0	7,0	6,0	4,0	2,0	0,0
Sol. d'Acide trichloracétique	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Taux de sulfamide en mg %	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	6,0	8,0	10,0

Étant donné que la réaction colorée disparaît progressivement au bout de 30 minutes, il convient d'employer cette gamme en même temps que le prélèvement à examiner pour réaliser la diazotation et le dosage du sulfamide. A cet effet, nous avons effectué les manipulations suivantes :

On ajoute dans chaque tube de la gamme-étalon ci-dessus 1 ml de solution fraîche de Nitrite de sodium ; on agite et on ajoute 5 ml de solution de diméthyl-α-naphtylamine. On effectue la lecture en comparant la teinte de l'échantillon à tester, préparé de la même façon, avec l'échelle-étalon. La lecture des résultats doit se faire dans les premières 10 minutes.

Pour parer à l'instabilité de la gamme-étalon, nous avons préféré employer la méthode de PAGET dans certains cas.

Cet auteur a élaboré une technique qui possède une gamme-étalon stable et est d'application facile. D'autre part, cette méthode utilise une solution alcaline, ce qui amène la solubilisation des protéines présentes dans nos milieux de cultures et qui sont précipitées par l'Acide trichloracétique ; on évite ainsi la filtration.

Matériel nécessaire :

1) *Solution d'Acide trichloracétique à* 20 %.
2) *Solution de Nitrite de sodium à* 1 %.
3) *Solution alcaline de Thymol :*

Thymol	0.5 g
Solution N de Soude q.s.p.	50.0 ml

4) *Solution titrée de sulfamide.* selon le produit à doser : d'habitude, on emploie des solutions à 1 % de sulfamide.

Préparation de la gamme-étalon :

On prépare 7 tubes, que l'on dispose de la façon suivante :

TABLEAU N° 5

Réactifs en ml	Tubes N°						
	1	2	3	4	5	6	7 (*)
Sol. de sulfamide	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,0
Eau distillée	2,9	2,8	2,7	2,6	2,5	2,4	2,5
Sol. trichloracétique	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Sol. Nitrite de sodium	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Sol. alcaline de Thymol	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Prélèvement à examiner	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5
Taux en mg %	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	

(*) Prélèvement à examiner.

Les colorations apparaissent instantanément et on compare le prélèvement en étude avec la gamme-étalon. Celle-ci est stable et peut se conserver pendant plusieurs mois en tubes scellés et à l'obscurité. Si la coloration du tube contenant le prélèvement est trop faible ou trop forte, on augmentera ou diminuera la quantité de prélèvement employé, pour tomber dans la zone des tubes de la gamme-étalon.

Pour le calcul du taux de *sulfamide*, il faut se rappeler que 1 ml de la solution titrimétrique de Nitrite de sodium N/10 correspond aux doses suivantes des différents sulfamides :

Sulfanilamide (1162 RP ou Exoseptoplix Théraplix) 0,01722 g
Sulfadiazine (Abiazine Théraplix) ..... 0,02503 g
Sulfadiazine de sodium (Soludiazine Théraplix) .... 0,01723 g
Sulfaguanidine (Ganidan Spécia) ..... 0,02142 g
Sulfamérazine (Sumédine Spécia) ..... 0,02643 g
Sulfamérazine de sodium (Solumédine Spécia) ..... 0,02863 g
Sulfathiazol (Cibazol, Thiazomide Spécia) ..... 0,02553 g
Sulfapyridine (Dagénan Spécia) ..... 0,02493 g
Succinylsulfathiazol (Thiacyl Théraplix) ..... 0,03545 g

CHAPITRE V

DOSAGE DES BIOSTIMULINES

En nous basant sur les travaux de FAUDI, nous avons dosé les Biostimulines par la *méthode gazométrique*, en utilisant comme germe-test *Zymomonas mobile*, *Lindner*. En effet, MEYER, BURLET et FAUDI ont constaté que ce germe ne donne de croissance optimale qu'en présence de Biostimulines ou d'extrait placentaire.

Zymomonas mobile a été isolé en 1925 à partir de jus d'agaves par LINDNER qui l'a nommé *Termobacterium mobile*, le considérant comme l'un des germes les plus petits connus à ce moment. Il a besoin, pour son développement, de glucose et de levulose; il ne dégrade ni le mannose, ni le galactose, ni le maltose, ni le lactose, ni le raffinose, ni l'arabinose, ni le mannitol, ni la dextrine. Cependant, il a besoin d'un *biostimulateur* pour se développer, qui existe en grande quantité dans le moût de bière. Une des propriétés les plus caractéristiques de cette bactérie est d'utiliser complètement les sucres assimilables en libérant une très grande quantité de gaz carbonique. GIBBS et DEMOSS (35) ont constaté que *Zymomonas mobile* dégrade le glucose en fermentation anaérobie, en produisant à partir d'une molécule de glucose 1,8 molécule de CO_2 et 1,9 molécule d'éthanol ainsi qu'une trace d'acide lactique. Les travaux de ces auteurs montrent les caractéristiques différentielles très nettes du pouvoir enzymatique de cette bactérie et permettent d'expliquer la forte production d'alcool de cet organisme à partir du glucose.

Ce germe est très thermosensible et ne résiste pas aux températures dépassant 30°. L'optimum cultural se situe entre 18° - 27°. Lors de nos expériences, nous avons entretenu notre souche sur *un milieu de moût de bière non houblonné*, à 4 % de glucose et 2 % de gélose. En milieu liquide, le *Zymomonas mobile* produit une forte fermentation dans les six premiers jours de culture et sa conservation nécessite dans ces conditions un repiquage régulier tous les 15 jours. Pour les autres propriétés microbiologiques et morphologiques, nous renvoyons aux travaux de FAUDI et ILLIEN.

Pour nos expériences, nous avons employé, en dehors du milieu au moût de bière, un substrat semi-synthétique *Difco : le Bacto Pantothénate Assay Medium* complété par addition de 200 γ% de Pantothénate de calcium.

Pour le dosage *des Biostimulines*, nous avons été obligé de préparer ce milieu à double concentration (c'est-à-dire 150 g de poudre Difco pour

1 000 ml), vu qu'il faut constituer une gamme contenant des doses croissantes de produits à tester et qu'on complète à 10 ml avec de l'eau distillée pour avoir un volume identique dans les tubes. Nous avons donc procédé d'après le schéma suivant :

TABLEAU N° 6

Réactifs en ml	Tubes N°					
	1	2	3	4	5	etc.
Milieu Difco	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	etc.
Eau distillée	4,0	3,5	3,0	2,5	2,0	etc.
Extrait placentaire à tester	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	etc.

Tyndalliser trois fois pendant 1 heure à 80°.

Ensemencer tous les tubes avec 0.5 ml de la suspension bactérienne préparée comme indiqué ci-dessous.

Il faut noter que la concentration en glucose ne doit pas dépasser 4 % au maximum pour éviter la caramélisation du sucre et la formation de produits freinant la croissance du *Zymomonas*.

La préparation de la suspension d'inoculat de *Zymomonas* doit être effectuée à partir d'une culture sur milieu moût de bière gélosé âgée au maximum de 48 heures, à raison de 4 öses ml d'eau distillée (ne pas employer de soluté physiologique). On doit utiliser cette suspension immédiatement à raison de 0,5 ml par tube.

Pour doser le taux de *Biostimulines* on évalue quantitativement le gaz carbonique mis en liberté au moyen d'une cloche à gaz (*tube de Besson ou de Durham gradué*) : ce tube a 6 cm de long et 0.6 cm de diamètre, sa contenance est de 1,5 ml et il est gradué au 1/10e, permettant ainsi de lire le volume de gaz dégagé, que nous exprimons en 1/15e, 2/15e, etc. jusqu'à 15/15e.

La gamme de tubes ainsi préparée est disposée à l'étuve à 27° et on contrôle la croissance de la bactérie et le taux de *Biostimulines* en rapport avec la quantité de gaz développée après 12 — 24 — 36 et 48 heures. La lecture des résultats doit de toutes façons se faire dans les premières 60 heures de culture ; au-delà de ce temps, la lecture n'est plus valable parce que les témoins sans facteur de croissance peuvent également donner un dégagement gazeux tardif.

Tout d'abord, on détermine par tâtonnement la quantité d'extrait biogène se prêtant le mieux à ces conditions expérimentales, puisque si la dose de *Biostimuline* est trop faible, le temps d'expérience est trop prolongé.

Pour nos expériences, nous avons employé un extrait biogène de germes de maïs préparé selon les indications de FAUDI et que nous avons utilisé comme référence dans nos expériences ultérieures. Nous avons établi une gamme contenant 0,5 — 1,0 — 2,0 — 3,0 — 5,0 ml de cet extrait de germes de maïs. Cette expérience nous a donné les résultats suivants :

TABLEAU N° 7

Extrait de germes de maïs	Temps en heures							
	12	24	36	48	60	72	84	96
0,5 ml	—	—	—	3/15	10/15	11/15	—	—
1,0	—	—	2/15	7/15	11/15	14/15	15/15	—
2,0	—	1/15	4/15	10/15	15/15	—	—	—
3,0	±	5/15	10/15	15/15	—	—	—	—
5,0	±	5/15	8/15	13/15	15/15	—	—	—

Toutes les expériences ont été effectuées en cinq séries et les valeurs indiquées sur le tableau représentent la moyenne de ces cinq essais. A noter que ces expériences préliminaires ont été effectuées au moyen du milieu Difco à double concentration et sans addition supplémentaire de glucose.

Après avoir ainsi constaté que 3 ml de notre extrait à 20 % de germes de maïs fournissaient les meilleurs résultats, nous avons utilisé cette dose comme témoin dans nos expériences ultérieures.

CHAPITRE VI

CONTROLE DE L'INTERACTION DES SUBSTANCES ANTIBACTÉRIENNES

Comme nous l'avons fait ressortir dans *l'Historique*, MANTEN et WISSE affirment que de l'association de deux produits antibactériens peut résulter un effet *antibactérien additif, synergique ou antagoniste.*

P. KLEIN préconise une classification plus détaillée; en se basant sur les principes de la pharmacologie, il distingue les groupes suivants : *synergisme additif, synergisme subadditif, potentialisation, activation catalytique, antagonisme, interférence, action frénatrice.*

En nous référant à ces principes, nous avons entrepris nos expériences. Il est bien entendu qu'il faut avoir recours à des milieux de culture dépourvus de substances telles que l'Acide para-aminobenzoïque, les dérivés de l'Acide folique, certaines substances protéiques, etc., qui peuvent présenter un antagonisme spontané vis-à-vis des antibiotiques et sulfamides mis en expérience, ce qui fausserait évidemment les résultats. C'est pour cette raison que nous avons le plus souvent employé le milieu de FRŒHLICH modifié et le *Bacto Penassay Broth Difco.* Nous aurons l'occasion de revenir sur ces facteurs inhibiteurs ultérieurement.

Il faut examiner le problème que nous nous sommes posé en choisissant :

1) le couple d'association des produits antimicrobiens;
2) la bactérie-test devant démontrer l'activité synergique ou antagoniste des antibiotiques associés.

Ces recherches nécessitent un grand nombre d'essais, et nous ne rapportons que quelques exemples typiques.

Synergisme additif :

Il s'agit de l'association d'un sulfamide : *Sulfathio-urée* (Fontamide Spécia) et de la *Pénicilline.* L'addition à la Pénicilline de doses données d'autres sulfamides : *Sulfathiazol, Sulfatholamide, Sulfapyridine, Sulfanilamide, Sulfaéthidol* et *Sulfaguanidine,* nous a donné des résultats analogues.

L'association *Pénicilline* + *Sulfathio-urée* est ajoutée à un milieu synthétique aux doses indiquées dans le tableau ci-après. Nous avons

choisi un milieu synthétique, sachant que des produits protéiniques ou le sérum ont une certaine action antisulfamide. La bactérie-test est *Staphylococcus aureus, producteur de Pénicillinase*, mis à notre disposition par CHABERT. Cette bactérie-test a été sélectionnée en nous basant sur les travaux de J.G. FAUDI. En effet, dans une étude sur le diagnostic des Staphylocoques pénicillino-résistants, CHABERT et SUREAU (36) ont pu différencier trois types de souches de *Staphylocoques :*

1) *Des souches ne sécrétant pas de Pénicillinase*, présentant une sensibilité voisine de celle du *Staphylocoque d'Oxford* et ne variant pas, quelle que soit la dose d'inoculat.

2) *Des souches résistantes, non productrices de Pénicillinase*, également stables vis-à-vis de la dose d'inoculat.

3) *Des souches sécrétant de la Pénicillinase*, restant plus sensibles que la souche d'Oxford à la Pénicilline tant que l'inoculat ne dépasse pas 10^{-6} germes par ml, mais atteignant des taux plusieurs centaines de fois supérieurs pour les inoculats plus importants.

La plupart des souches de *Staphylocoques* isolés en clinique et résistant à la Pénicilline appartient au troisième groupe. FAUDI a pu prouver, lors de ses expériences, que *le Staphylocoque* lui servant de bactérie-test appartient au troisième groupe et qu'il est sensible à 3 U.O. de Pénicilline à condition d'employer un inoculat relativement faible, alors qu'avec un ensemencement fort, le germe devient résistant à partir de 250 U.O. de Pénicilline. Nous avons donc employé ce Staphylocoque à dose d'inoculat faible.

Pour le Sulfathio-urée, nous avons fait des dosages préliminaires qui nous ont prouvé que ce sulfamide inhibe la croissance de notre *Staphylocoque* à la dose de 200 γ/ml. La courbe enregistrant l'action du sulfamide entre 200 γ/ml et 0 γ/ml évolue selon une droite. Connaissant ces faits, nous avons effectué les essais suivants au moyen du milieu de culture synthétique préconisé par FRŒHLICH (37) et modifié d'après les données de LWOFF (38) :

Protéolysat Ronchèse	10,00 g
Glycérophosphate de fer	0,05 g
Phosphate bipotassique	0,50 g
Chlorure de sodium	3,00 g
Sulfate de potassium	0,50 g
Chlorure de magnésium	0,50 g
Chlorure d'ammonium	3,00 g
Glucose	40,00 g
Glycérine	5,00 g
Amide nicotinique	0,04 g
Vitamine B_6	0,04 g
Vitamine B_1	0,04 g
Tryptophane	0,20 g
Asparagine	1,00 g

Leucine ..... 0,20 g
Acide glutamique ..... 1,00 g
Eau distillée q.s.p. ..... 1000,0 ml
pH = 6,4

TABLEAU N° 8

Pénicilline γ/ml	%	Sulfathio-urée γ/ml	%	Transmission en % de la courbe	
				étalon	expérimentale
0,60	100 %	0,0	—	95	95
0,54	90 %	20	10 %	94	94
0,48	80 %	40	20 %	81	90
0,42	70 %	60	30 %	74	83
0,36	60 %	80	40 %	67	74
0,30	50 %	100	50 %	60	60
0,24	40 %	120	60 %	67	67
0,18	30 %	140	70 %	74	74
0,12	20 %	160	80 %	81	81
0,06	10 %	180	90 %	88	88
0,0	—	200	100 %	95	95

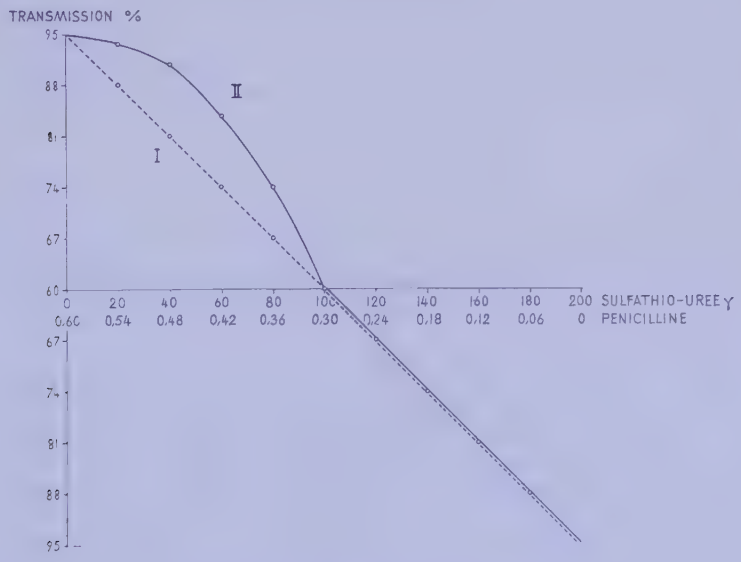

Fig. 3

En abscisse : les taux de Pénicilline et de Sulfathio-urée
- - - - - - - - -: courbe théorique d'activité du Sulfathio-urée ou de la Pénicilline
———— : courbe expérimentale d'activité du mélange Pénicilline + Sulfathio-urée (compensation entre les taux de Pénicilline et de sulfamide).

Si nous prenons en considération la *courbe expérimentale*, nous remarquons qu'il y a un *synergisme additif* entre la Pénicilline et le Sulfathio-urée vis-à-vis de notre souche de *Staphylocoque*, situé pour la Pénicilline entre 0,60 et 0,30 γ/ml et pour le sulfamide entre 20 et 100 γ/ml. A partir de la dose limite de 0,30 γ/ml de Pénicilline, son activité antibactérienne devient nulle, de sorte qu'à partir de 100 γ/ml de sulfamide l'activité enregistrée est due uniquement à ce dernier.

Dans les doses limites d'activité indiquées, on voit que les deux courbes ne s'écartent pas sensiblement, *on se trouve donc en présence d'un synergisme additif entre les deux produits antibactériens.*

Nous avons jugé nécessaire de contrôler la concentration des deux antibiotiques. Pour le Sulfathio-urée, nous avons effectué une gamme de 100 à 600 γ/ml, ce qui nous a permis de constater que la dose inhibitrice définitive se situe entre 200 et 300 γ/ml. Nous avons employé la technique de Paget en détruisant la Pénicilline par addition de 100 U./ml de *Pénicillinase Difco*. La Pénicilline est détruite par un contact d'une heure à 37°. La dose limite de croissance du sulfamide se situe entre 220 et 260 γ/ml, taux se rapprochant de celui trouvé par dosage chimique et conforme à nos conditions expérimentales.

Pour le dosage de la Pénicilline, nous avons ajouté au mélange antibactérien de l'Acide para-aminobenzoïque à la dose de 10 γ/ml, suffisante pour inhiber le Sulfathio-urée. Le milieu ainsi privé de l'activité du sulfamide a été ensemencé avec une souche de *Staphylococcus aureus PCI-209 P.* Dans ces conditions la croissance de la bactérie est inhibée aux doses de 0,54 à 0,60 γ/ml, ce qui prouve la présence et l'activité de la Pénicilline mise à l'épreuve.

Potentialisation :

Pour démontrer la potentialisation obtenue par association de deux antibactériens, nous prendrons de nouveau comme exemple l'association *Pénicilline + Sulfathio-urée*, en employant comme bactérie-test *Staphylococcus aureus PCI-209 P.*

Comme précédemment, nous avons déterminé la dose inhibitrice pour la Pénicilline et pour le Sulfathio-urée seuls, doses considérées comme 100 %. On prépare ensuite une gamme de milieu dans lequel on introduit une concentration invariable de 50 % de la dose inhibitrice du Sulfamide et des doses progressivement croissantes de Pénicilline. On note la dose de cette dernière qui occasionnera dans ces conditions l'inhibition totale du Staphylocoque doré (0,05 γ/ml).

Nous répétons la même expérience en employant des doses décroissantes de Sulfathio-urée : de 200 à 5 γ/ml, et de Pénicilline : de 0,15 à 0,01 γ/ml. Nous reproduisons dans le tableau suivant les résultats ainsi obtenus en rapport avec les différentes doses de Pénicilline et de sulfamide.

TABLEAU N° 9

Pénicilline γ/ml	Sulfathio-urée γ/ml	% de transmission par rapport au témoin formolé : 95 %
0,60	0	95
0,15	5	81
0,12	10	84
0,10	20	87
0,08	40	90
0,06	80	92
0,05	100	93
0,04	120	94
0,03	140	94
0,02	160	95
0,01	180	95
0,0	200	95

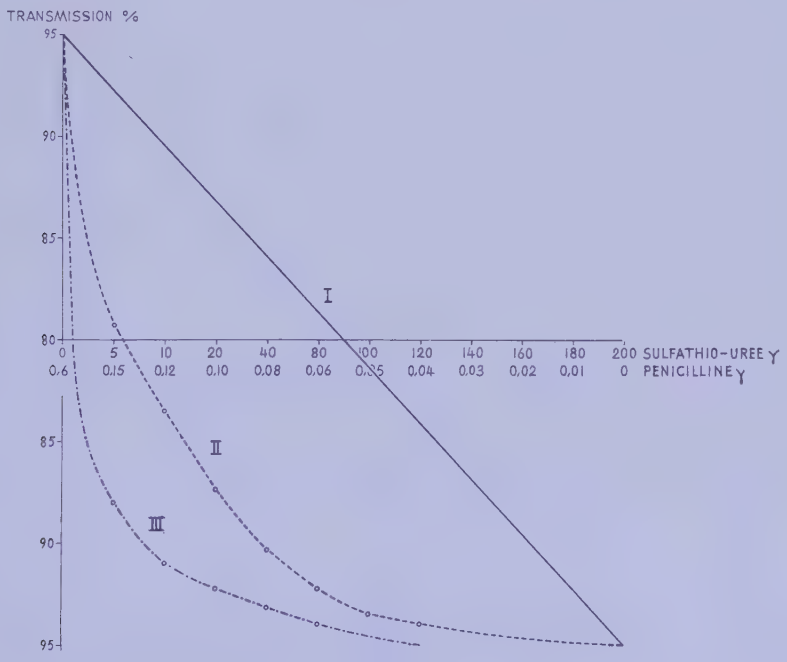

Fig. 4

Exemple de potentialisation : Sulfathio-urée + Pénicilline. Bactérie-test : Staph. aureus PCI 209 P

courbe I ———— : étalon.
courbe II - - - - - - - - : expérimentale avec Sulfathio-urée + Pénicilline.
courbe III — - — - — : expérimentale avec Sulfathio-urée + Pénicilline + Biostimuline.

Ces valeurs ont été rapportées sur le graphique ci-devant, dans lequel nous avons enregistré la courbe-étalon et la courbe de croissance enregistrée en présence des deux antibactériens. En abscisse nous inscrivons les taux de Sulfathio-urée et de Pénicilline, puis en ordonnée le pourcentage de lumière transmise.

En considérant cette courbe (N° II du graphique), on constate que la dose frénatrice de la Pénicilline en présence de doses croissantes de Sulfamide se différencie nettement de celle de la courbe témoin. En présence de 20 % de la dose frénatrice de sulfamide, l'activité antibactérienne de la Pénicilline ne correspond plus à 80 %, comme dans le synergisme additif, mais à 6 % seulement, soit 1/13e environ. Par rapport à la croissance microbienne, l'activité frénatrice de la synergie de ces deux produits correspond à une *potentialisation ;* comme on le voit, la courbe longe les deux coordonnées sur un parcours assez long et la croissance *du Staphylocoque* est effectivement enregistrée par la cellule photoélectrique dans les limites de 0,15 γ /ml de Pénicilline et de 80 γ /ml de sulfamide.

Activation catalytique :

Comme exemple de l'action d'un *activateur catalytique*. nous rapportons une expérience effectuée avec du *Cobalt* et de la *Pénicilline*, avec comme bactérie-test *Staphylococus aureus PCI-209 P.* On sait que le Cobalt en lui-même est inactif, du moins introduit à petites doses dans le milieu. Nous l'avons utilisé à raison de 0,05 — 0,10 — 0,15 mg /ml et, à chacun de ces taux de Cobalt, nous avons ajouté des gammes décroissantes de Pénicilline, selon nos expériences précédentes. On ensemence, dispose à l'étuve à 37° pendant 24 heures et on lit les résultats.

TABLEAU N° 10

Pénicilline γ/ml	Témoin sans cobalt	Taux de cobalt en mg /ml		
		0,05	0,10	0,15
0,6	95 %	95 %	95 %	95 %
0,54	95 %	94 %	92 %	88 %
0,48	94 %	90 %	83 %	82 %
0,42	92 %	81 %	78 %	77 %
0,36	90 %	76 %	73 %	71 %
0,30	86 %	71 %	67 %	66 %
0,24	78 %	67 %	62 %	60 %
0,18	70 %	61 %	57 %	55 %
0,12	60 %	56 %	53 %	51 %
0,06	54 %	51 %	50 %	50 %
0,00	50 %	50 %	50 %	50 %

(Voir graphique N° 11, page 68)

En considérant ces résultats, on voit que l'activité antibactérienne de la Pénicilline seule s'exerce sur la croissance *du Staphylocoque doré*. En présence des trois doses de Cobalt, *on constate que l'activité de l'antibiotique est renforcée proportionnellement à la dose de Cobalt introduite dans le milieu*, ce qui se traduit par une évolution de la courbe vers une droite.

Étant donné que le Cobalt seul n'a pas d'action sur le développement du *Staphylocoque doré*, du moins aux doses employées par nous, on peut considérer qu'en présence de Pénicilline *il agit comme un activateur catalytique sur celle-ci*.

Pour expliquer ce phénomène, nous pouvons émettre l'hypothèse suivante : la présence de Cobalt favorise la genèse de la vitamine B_{12} par *le Staphylocoque;* nous savons en effet qu'il y a des microbes qui peuvent synthétiser la vitamine B_{12} et d'autres qui sont hétérotrophes, nécessitant l'apport d'un des éléments constitutifs de la Cyanocobalamine. Celle-ci est un nutrilyte pour certaines bactéries, comme divers *Lactobacilles*, ainsi que pour un mutant du Colibacille : *Escherichia coli* 113-3, etc. Pour ces bactéries, la Vitamine B_{12} constitue un facteur de croissance indispensable. Dans la véritable *Cyanocobalamine*, la base du nucléotide est le 5-6-*diméthyl-benzimidazol ;* d'autres facteurs actifs du groupe des Vitamines B_{12} diffèrent par la nature de ce nucléotide. La fraction non-nucléotidique est couramment appelée « *facteur B* » ; celui-ci est inactif pour certains *Lactobacilles*, alors qu'il est par exemple suffisant pour *Escherichia coli*, qui est donc capable de préparer le nucléotide et de le combiner au « *facteur B* ». Si, en présence de ce facteur, on fournit au *Colibacille* 113-3 des bases nucléotidiques différentes, on peut obtenir toutes les formes de Vitamine B_{12}, par exemple avec *l'Adénine* on obtient la *Pseudo-vitamine* B_{12}. Il doit en être de même pour *le Staphylocoque* qui, en présence de Cobalt, synthétise son *facteur B* qui, en se combinant avec les composants nucléiniques, donne naissance à la Vitamine B_{12} agissant comme facteur de croissance et activant la multiplication *des Staphylocoques* dans leur phase de latence.

Ainsi la Pénicilline, se trouvant en présence d'un germe en multiplication très prononcée, peut exercer son activité antibiotique au maximum. Cette hypothèse permettrait d'expliquer le rôle catalysant du Cobalt.

Antagonismes :

Ayant envisagé précédemment la Vitamine B_{12} comme facteur de croissance, nous allons, dans le même ordre d'idées, étudier *l'Acide para-aminobenzoïque* comme exemple de l'antagonisme.

Cette vitamine favorise encore une croissance optimale à la dilution de $1/10^{11}$ chez un grand nombre de bactéries pathogènes. Elle peut être inhibée par certains sulfamides, parce que, additionnés en excès assez forts, ces derniers peuvent se substituer à la vitamine par suite de leur constitution chimique très rapprochée, et peuvent ainsi interrompre,

comme nous l'avons déjà vu, la fonction physiologique spécifique de cette vitamine.

Une molécule d'Acide para-aminobenzoïque se fixe « *in vivo* » sur 10 à 12 molécules d'Acide glutamique. Les sulfamides sont sans action sur ce complexe. Pour réaliser l'effet antagoniste, il faut hydrolyser ces peptides pour libérer le facteur de croissance. L'Acide aminobenzoïque, agit seulement comme vitamine si le groupement NH_2 se trouve en position para. Il faut cependant mentionner qu'un certain nombre de sulfamides de préparation plus récente ne sont nullement influencés par la présence de l'Acide para-aminobenzoïque et ne constituent par conséquent pas des antivitamines. Ainsi, le *Marfanil* (*α-amino-para-toluène-sulfanile*) ne constitue pas un antagoniste de la Vitamine B_6. Son activité semble intervenir sur les processus d'oxydo-réduction et en particulier par destruction de la catalase. Mentionnons que l'Acide para-aminobenzoïque joue un rôle comme facteur de croissance en tant que constituant de l'Acide folique.

Pour prouver l'antagonisme entre cette vitamine et un sulfamide, nous rapportons une expérience au moyen de *Sulfadiazine*, dont l'action frénatrice est étudiée en présence de la souche de *Bacillus subtilis ATCC* 6633.

Nous employons *la Sulfadiazine* aux doses de 0,050 à 6,4 γ/ml et le taux d'*Acide para-aminobenzoïque* varie entre 0,004 et 0,25 mg/ml. Le milieu de culture est le suivant :

Phosphate monopotassique	1,0 g
Chlorure de sodium	0,5 g
Sulfate de magnésium	0,5 g
Sulfate d'ammonium	4,5 g
Glucose	10,0 g
Eau distillée	1000,0 ml

Le pH est ajusté à 7,2 au moyen de Phosphate disodique en solution saturée ; le milieu est stérilisé à 105° pendant 30 minutes. Dans le tableau suivant nous rapportons les résultats de cette expérience :

TABLEAU N° 11

Sulfadiazine γ/ml	Acide para-amino-benzoïque γ/ml	% de transmission	
		Sulfadiazine seule	Sulfadiazine + Acide para-amino-benzoïque
0,05	0,0	55	54
0,10	4,0	60	52
0,20	8,0	64	55
0,40	16,0	71	56
0,80	32,0	75	52
1,60	64,0	81	53
3,20	125,0	86	54
6,40	250,0	90	52

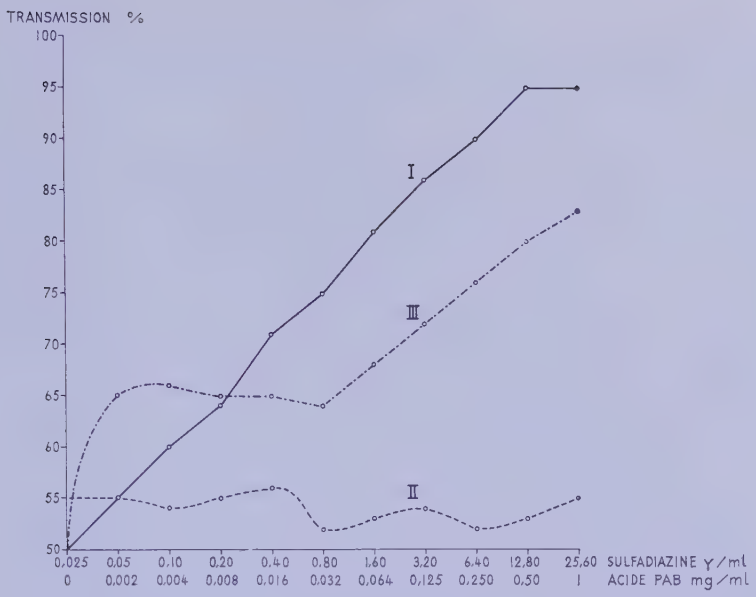

Fig. 5

Exemple d'antagonisme : entre Sulfadiazine et Acide p-aminobenzoïque.
Bactérie-test : Bacillus subtilis ATCC-6633

Courbe I ———————— : Sulfadiazine seule.

Courbe II - - - - - - - - - - : Sulfadiazine + Acide PAB.

Courbe III — - — - — - - : Sulfadiazine + Acide PAB + Biostimuline.

En considérant ce graphique, on se rend compte qu'il y a un rapport proportionnel entre les concentrations de Sulfadiazine et d'Acide para-aminobenzoïque, de sorte que la croissance est sensiblement égale dans tous les tubes. Le phénomène que nous venons de décrire est symptomatique pour *l'antagonisme compétitif.*

Ce fait prouve également l'importance du substrat nutritif que l'on emploie au cours de ces expériences et qui doit être exempt de toute trace d'inhibiteur pouvant entrer en compétition avec le sulfamide ou l'antibiotique que l'on veut examiner. On voit également que 1 γ/ml d'Acide para-aminobenzoïque est capable d'annuler l'action antibactérienne de 26 γ/ml de Sulfadiazine. Ce rapport est caractéristique et spécifique d'un sulfamide donné sensible à l'Acide para-aminobenzoïque : on lui a donné le nom d'« *indice d'inhibition* ». Il est de 1/20 000 pour le Sulfanilamide et peut atteindre 1/100 pour les sulfamides plus récents ; pour le Sulfathiazol par exemple, il est de 1/36. Il faut cependant se rappeler que cet indice dépend également de la bactérie-test.

Interférence :

Comme exemple du phénomène *d'interférence*, nous avons choisi l'association *Chloramphénicol + Sulfathio-urée.* L'action inhibitrice de

cette association est contrôlée au moyen de *Staphylococcus aureus PCI* 209 *P.* D'après la classification de MANTEN et WISSE, il s'agit de deux antimicrobiens à action bactériostatique.

On sait que la dose inhibitrice du *Chloramphénicol* seul se situe selon les bactéries-test entre 1,0 et 6,0 γ/ml. Le *Bacille subtilis* ATCC 6633, ensemencé dans le *Bacto Penassay Broth Difco* à pH = 6,5, répond à la sensibilité de 1 γ/ml; par contre, d'autres bactéries employées dans la pratique microbiologique courante, telles que la souche *B. subtilis* ATCC 4969, le *Staphylocoque doré* PCI 209 P, présentent une limite d'activité antibactérienne entre 3 et 6 γ/ml. Pour expliquer l'action antibactérienne du *Chloramphénicol*, nous donnons un graphique emprunté à P. KLEIN, qui montre l'activité de différentes doses de *Chloramphénicol* sur *Eberthella typhi*.

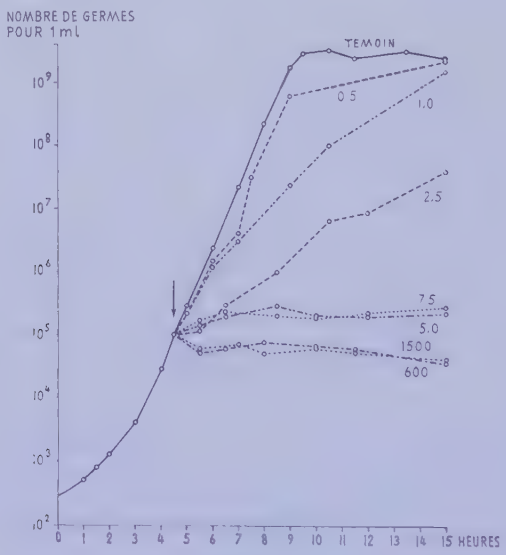

Fig. 6

Action du Chloramphénicol sur la croissance d'Eberthella typhi (d'après P. KLEIN).

En abscisse on trouve les heures de culture et en ordonnée le nombre de germes par ml. Les doses de *Chloramphénicol* sont introduites 4 heures 30 après l'ensemencement et leur taux est inscrit sur chaque courbe. L'antibiotique est par conséquent introduit au moment où la culture se trouve déjà en phase exponentielle.

Les doses limites choisies sont de 0,5 γ/ml et 1500 γ/ml. La culture témoin évolue suivant une progression logarithmique qui est terminée, comme on le voit sur la courbe, après 10 heures. Pour les cultures en présence de l'antibiotique, la croissance des germes est ralentie proportionnellement aux doses employées. Les concentrations faibles freinent

le développement d'une façon peu marquée, tandis que les doses plus fortes, égales ou supérieures à 5 γ/ml, provoquent un arrêt définitif de la croissance.

Le mécanisme d'action semble cependant identique dans les deux cas; il faut insister sur deux faits :

— *le ralentissement de croissance se manifeste immédiatement après l'addition de l'antibiotique à la dose minimale active* et l'activité n'exige pas de période d'attente.

— D'autre part, *la dose minimale inhibante bloque tous les processus de multiplication.* Des doses plus fortes ont un effet absolument identique à celui de cette dose minimale. Il ne s'agit pas d'une bactéricidie, mais d'une bactériostase, puisque toutes les subcultures effectuées à partir de cultures-mères, même à taux maximal de *Chloramphénicol*, reprennent leur développement.

Insistons cependant sur le fait que l'exemple choisi par KLEIN ne peut pas être généralisé et est valable seulement pour *Eberthella typhi* et quelques autres bactéries Gram-négatives. Si l'on emploie des bactéries-test Gram-positives, telles que *Bacillus subtilis* ou *Staphylococcus aureus*, *le Chloramphénicol* a une action bactéricide dont la dose minimale inhibitrice pour ces germes se situe à environ 33 γ/ml. Dans l'exemple que nous avons choisi, il s'agit par conséquent d'un processus bactéricide.

Nous donnons dans le graphique N° 7 l'illustration de l'action bactéricide des différentes doses de *Chloramphénicol sur le Staphylocoque doré* en rapport avec le nombre des colonies survivantes.

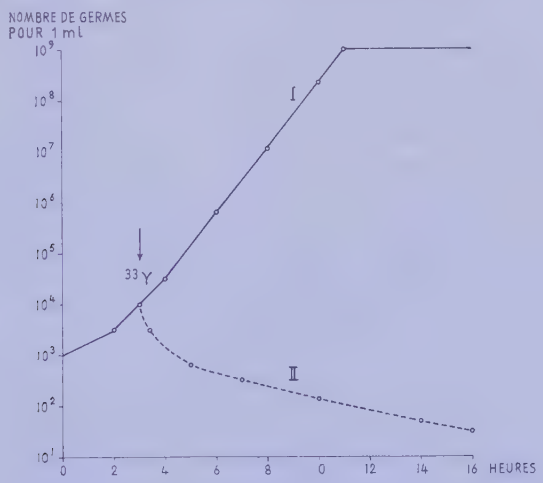

Fig. 7

Action du Chloramphénicol (33 γ) sur Staphylococcus aureus PCI 209 P.

Courbe I ———— : témoin.

Courbe II - - - - - - - - - - : courbe expérimentale.

L'action bactéricide devient effective chaque fois que le germe trouve dans le substrat des produits azotés assimilables et son intensité est proportionnelle à la vitesse de multiplication de la bactérie en expérience.

Pour réaliser le *phénomène d'interférence*, nous avons introduit 5 heures après l'ensemencement 6,0 γ/ml de *Chloramphénicol ; le Sulfathio-urée* a été employé aux doses de 0,25 à 256 γ/ml. Le taux de 6,0 γ/ml de Chloramphénicol a été choisi après une série d'expériences à des concentrations allant de 1,0 à 100 γ/ml.

TABLEAU N° 12

Chloramphénicol γ/ml	Sulfathio-urée γ/ml	% de transmission	
		Sulfathio-urée seul	Sulfathio-urée + Chloramphénicol
6,00	0,5	55	78
6,00	1,0	60	79
6,00	2,0	66	82
6,00	4,0	73	87
6,00	8,0	83	95
6,00	16,0	89	95
6,00	32,0	94	95
6,00	64,0	95	82
6,00	128,0	95	83
6,00	256,0	95	95

En considérant la courbe résultant de *l'interaction entre le sulfamide et le Chloramphénicol*, on s'aperçoit que l'activité frénatrice du Chloramphénicol vis-à-vis du *Staphylocoque* est augmentée jusqu'à huit fois en présence de certaines doses de sulfamide. L'effet maximal n'est obtenu que pour des concentrations atteignant entre 7,50 et 32 γ/ml de sulfamide. On voit qu'en présence d'une dose fixe de 6,0 γ/ml de Chloramphénicol, les doses dépassant 32 γ/ml de Sulfathio-urée freinent son action, d'où résulte le *phénomène d'interférence*.

Nous pourrions tenter d'expliquer ce phénomène d'une part par l'entrée en action immédiate *du Chloramphénicol* et d'autre part par le temps de latence nécessaire au *sulfamide*. Nous avons vu par ailleurs que l'action bactéricide du *Chloramphénicol* se situe à environ 5 γ/ml; le Sulfathio-urée à fortes doses affaiblit plus ou moins l'activité de l'antibiotique, de sorte que ce dernier n'est plus bactéricide, mais bactériostatique. Il y a *donc interférence entre les différentes doses de Chloramphénicol et de Sulfamide*, se répercutant sur le développement du *Staphylocoque*.

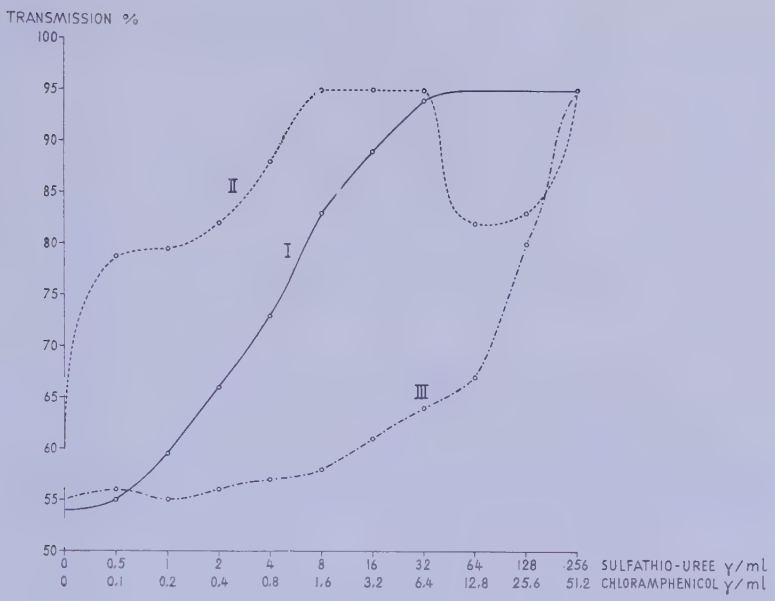

Fig. 8

Exemple d'interférence.

Le Chloramphénicol à dose fixe de 6,0 γ/ml + Sulfathio-urée aux doses de 0,5 à 256 γ/ml
Bactérie-test : Staphylococcus aureus PCI-209 P.

Courbe I ———————— : témoin : sulfamide seul.

Courbe II - - - - - - - - - - : courbe expérimentale.

Courbe III - — - — - — - : témoin : Chloramphénicol seul à doses progressivement croissantes, inscrit à titre de comparaison (voir Fig. 12, page 71).

Action frénatrice :

Pour démontrer l'action frénatrice d'une association d'antibiotiques, nous mettrons en jeu la *Pénicilline* et la *Terramycine* en présence de *Staphylococcus aureus* PCI 209 P. Nous savons que 1 U/ml de Pénicilline = 0,6 γ/ml environ amène la mort d'une culture de *Staphylocoques*. D'autre part, le même germe ensemencé sur le même milieu contenant 0,5 γ/ml de Terramycine est inhibé par un phénomène de bactériostase. Cette dose représente l'activité maximale bactériostatique.

Si nous associons les deux antibiotiques, il en résulte un effet qui ne se différencie pratiquement pas de celui de *la Terramycine* seule. Le mélange des deux antibiotiques s'exprime donc par un phénomène de bactériostase identique à celui de *la Terramycine et l'effet bactéricide de la Pénicilline semble complètement supprimé.* Nous donnons un graphique qui illustre ce phénomène, nous portons en abscisse les heures de culture et en ordonnée les doses de glucose consommées en rapport avec *les taux de Pénicilline et de Terramycine* présents dans le milieu. L'assimilation

du glucose nous sert de test pour contrôler la croissance et la vitalité *du Staphylocoque* mis en présence des deux antibiotiques, dont les concentrations sont indiquées pour chaque courbe.

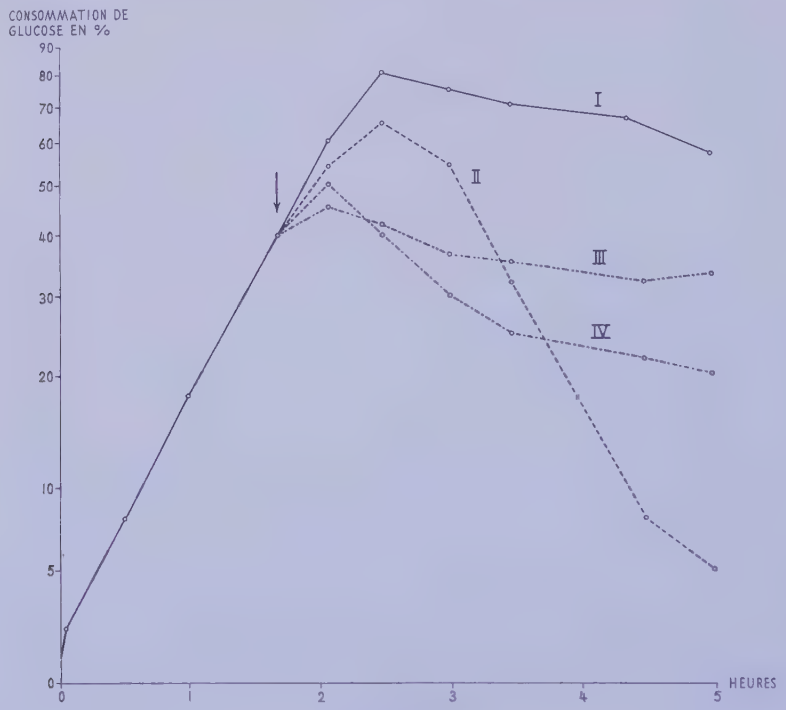

Fig. 9

Exemple de l'action frénatrice de l'association Pénicilline + Terramycine.
Bactérie-test : Staphylococcus aureus PCI-209 P.

Courbe I ———————— : témoin.
Courbe II - - - - - - - - - - : Pénicilline seule : 0,6 γ/ml.
Courbe III — - - — - - — : Terramycine seule : 0,5 γ/ml.
Courbe IV - — - — - — - : Pénicilline : 0,6 γ/ml + Terramycine : 0,5 γ/ml.

Pour expliquer cette action frénatrice de *la Terramycine sur la Pénicilline*, il faut se souvenir que la première a une action antibactérienne immédiate et freine le développement *du Staphylocoque*, qui entre dans une phase de latence. Sachant que *la Pénicilline* ne peut agir que sur des germes en phase exponentielle, nous comprenons la suppression de son action dans de telles conditions. *Ce phénomène frénateur se manifeste dans de nombreux cas d'association de bactériostatiques à action immédiate et de produits antimicrobiens à effet retard.*

Ayant ainsi illustré les différents phénomènes d'interaction de substances antibactériennes et concrétisé ces notions par des exemples typiques, nous pouvons à présent étudier *l'influence des Biostimulines dans ces différents cas.*

CHAPITRE VII

INFLUENCE DES BIOSTIMULINES SUR L'INTERACTION DES SUBSTANCES ANTIBACTÉRIENNES

Le taux de *Biostimulines* de notre extrait de germes de maïs a été déterminé en milieu de *Pantothenate Assay Medium Difco* complété par le Pantoténate de calcium, au moyen de la bactérie-test *Zymomonas mobile Lindner* selon les principes décrits dans le *Chapitre V* de ce travail. Nous avons adopté comme référence l'activité de 3 ml d'extrait de germes de maïs qui est de 15/15 en 36 heures.

En ce qui concerne l'action de *cette Biostimuline sur nos souches de Staphylocoque doré*, nous nous sommes référé à la technique indiquée par Faudi, en employant le milieu synthétique antérieurement décrit, et nous avons pu constater une augmentation nette de la croissance des Staphylocoques dans les tubes contenant la Biostimuline, par rapport au témoin. Les cultures contenant l'extrait de germes de maïs démarrent plus vite, proportionnellement à leur teneur en extrait biogène.

L'activité de notre extrait de germes de maïs a été contrôlée d'autre part, par rapport à notre souche de *Bacille subtilis* ATCC 6633 selon les mêmes principes, et nous avons pu constater les faits suivants :

La Biostimuline agit sur la croissance du Bacille subtilis en diminuant le temps de latence et en favorisant l'amorcement de la culture. L'optimum de croissance est le même dans tous les cas, mais il est plus rapidement obtenu lorsque l'extrait biogène est préalablement ajouté au milieu de culture.

Son addition après le terme de démarrage de la culture n'influe pas sur celle-ci.

Nous nous référons encore aux travaux de Faudi pour expliquer l'influence de l'extrait de germes de maïs sur les différentes souches de *Staphylococcus aureus*. Cet auteur a constaté :

1) que la sensibilité à *la Pénicilline d'un Staphylocoque* sensible n'est pas modifiée par la présence de *Biostimulines*.
2) Que l'extrait biogène augmente la résistance d'un *Staphylocoque* résistant par production *de Pénicillinase*.
3) Que ce même extrait de germes de maïs diminue la résistance d'un *Staphylocoque* résistant, non producteur de *Pénicillinase*.

De l'ensemble de ces données, il faut retenir que l'action des *Biostimulines* est double dans le cas d'un germe producteur de *Pénicillinase : il active la division cellulaire, mais en même temps augmente la production de Pénicillinase.* Cette augmentation se traduit par une résistance accrue en présence d'extrait de germes de maïs pour cette catégorie de bactéries.

Contrôle du synergisme additif en présence de Biostimulines :

Comme dans les expériences du chapitre précédent, nous avons employé le milieu synthétique modifié de Frœhlich car notre essai a été effectué avec *le Staphylocoque doré.* Ce substrat a été préparé à double concentration afin de pouvoir constituer des gammes contenant des doses progressivement croissantes de *Pénicilline*, allant de 0,06 à 0,6 γ/ml, et de *Sulfathio-urée* allant de 0,0 à 200 γ/ml.

Une série de tubes a été employée telle que, comme témoin, et l'autre était additionnée de 3 ml de notre extrait de germes de maïs. Le tableau ci-dessous rapporte le protocole expérimental et les résultats obtenus.

TABLEAU N° 13

Pénicilline γ/ml	Sulfathio-urée γ/ml	% de transmission	
		sans Biostimulines	avec Biostimulines
0,60	0	95	95
0,54	20	94	94
0,48	40	90	91
0,42	60	83	88
0,36	80	74	83
0,30	100	60	78
0,24	100	67	72
0,18	100	74	62
0,12	100	81	69
0,06	100	88	81
0,0	100	95	95

Nous avons vu antérieurement que l'association de *Pénicilline et de Sulfathio-urée* exerçait un *synergisme additif* sur le *Staphylocoque producteur de Pénicillinase*, et ceci jusqu'à une concentration de 0,30 γ/ml de Pénicilline et de 100 γ/ml de Sulfamide. En connaissance de ce fait, nous avons mis en œuvre dans l'expérience à l'extrait biogène des doses de *sulfamide* ne dépassant pas 100 γ/ml et de concentrations croissantes de *Pénicilline.*

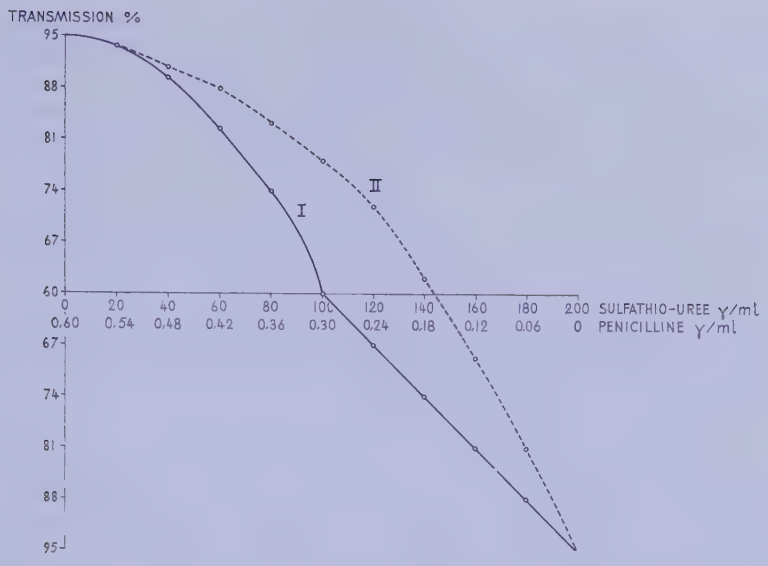

Fig. 10

Exemple de synergisme additif de potentialisation, en présence de Biostimuline, Sulfathio-urée + Pénicilline.

Bactérie-test : Staphylococcus aureus producteur de Pénicillinase.

Courbe I ——————: courbe expérimentale sans Biostimuline.

Courbe II - - - - - - - - - - : courbe expérimentale avec Biostimuline.

En considérant la courbe de croissance obtenue en présence d'extrait biogène, on voit que *le synergisme additif s'est transformé en une activité frénatrice de potentialisation*. En effet, le maximum de croissance s'est nettement déplacé, puisque pour la série témoin il se trouve aux doses de 0,30 γ/ml de Pénicilline et 100 γ/ml de sulfamide, alors qu'en présence de Biostimulines, il se situe à 0,18 γ/ml de Pénicilline et à 140 γ/ml de Sulfathio-urée; au taux de 0,30 γ/ml il y a dans ces conditions une inhibition de croissance se chiffrant à 80 % de transmission. On voit ainsi qu'il s'agit d'une *potentialisation* de l'activité antibactérienne du mélange *Sulfathio-urée + Pénicilline*, due à la présence *des Biostimulines* et s'exerçant principalement sur le sulfamide.

Le fait le plus intéressant à retenir de cette expérience, *est que le Staphylocoque producteur de Pénicillinase ne semble pas réagir à l'apport de l'extrait biogène dans nos conditions expérimentales*. Ceci s'explique par le fait que *les Staphylocoques* en général sont des germes allo-autotrophes ou plutôt allo-métatrophes d'après la conception de Lwoff, puisqu'en présence de composés organiques et des trois vitamines B_1, PP et B_2, ils sont capables de synthétiser leurs facteurs de croissance homologues.

D'autre part, cette expérience confirme les résultats trouvés par FAUDI, qui a pu démontrer que *les Staphylocoques sécrétant la Pénicillinase* réagissent à l'apport *de Biostimulines* par double réaction : *le facteur biogène active la division cellulaire, mais en même temps augmente la production de Pénicillinase*, d'où découle une augmentation de la résistance à la Pénicilline, à condition que la dose d'inoculat initiale ne soit pas trop massive.

On peut donc conclure *que l'extrait biogène renforce l'effet antibactérien du Sulfathio-urée.*

Il en va tout autrement si l'on emploie comme bactérie-test un *Staphylocoque ne sécrétant pas de Pénicillinase*, tel que le *Staphylocoque d'Oxford*, où l'on obtient une potentialisation vraie entre les deux produits antibactériens, comme nous allons le voir.

Contrôle de la potentialisation en présence de Biostimulines :

Cette expérience a été réalisée avec le *Staphylocoque doré PCI 209 P ;* en procédant comme dans l'expérience relatée dans le chapitre précédent, mais en présence de 3 ml d'extrait biogène, nous nous sommes rendu compte que la croissance de notre bactérie-test a été inhibée aux doses de 0,04 γ/ml de Pénicilline et de 120 γ/ml de sulfamide.

Nous avons donc renouvelé cet essai en employant des doses décroissantes de Pénicilline allant de 0,6 à 0,02 γ ml et de Sulfathio-urée allant de 200 γ/ml à 2 γ/ml.

TABLEAU N° 14

Pénicilline γ/ml	Sulfathio-urée γ/ml	% de transmission	
		sans Biostimulines	avec Biostimulines
0,60	0,0	95	95
0,15	5	81	87
0,12	10	84	91
0,10	20	87	92
0,08	40	90	93
0,06	80	92	94
0,05	100	93	95
0,04	120	94	95
0,03	140	94	95
0,02	160	95	95
0,0	200	95	95

(Voir figure N° 4, courbe III, page 53)

En considérant la courbe III de la figure N° 4 on se rend compte que l'association Pénicilline + Sulfamide révèle, en présence de Biostimuline et pour le *Staphylocoque doré pénicillino-sensible, un véritable effet de potentialisation*, puisque nous voyons que dans ce cas la dose de 4 γ/ml de sulfamide et de 0,20 γ/ml de Pénicilline d'une part, et celles de 80 γ/ml de sulfamide et de 0,06 γ/ml de Pénicilline d'autre part, inhibent le développement de ce germe. La zone de croissance effective se situe dans les limites des concentrations respectives de sulfamide et de Pénicilline suivantes : 5 + 0,15 γ/ml et 40 + 0,08 γ/ml.

On voit ainsi la différence d'activité d'une association d'antibiotiques additionnée de Biostimulines sur un *Staphylocoque pleinement sensible* et sur un *Staphylocoque producteur de Pénicillinase ;* pour ce dernier (voir figure N° 10) la Biostimuline, en activant la croissance du germe, engendre en même temps une augmentation de la production de Pénicillinase, se traduisant par une résistance accrue à l'antibiotique, qu'elle élimine de la compétition avec l'autre antibactérien mis en jeu.

Nous constatons en effet que la croissance du *Staphylocoque producteur de Pénicillinase* est nettement favorisée par *la Biostimuline* et que le tracé de la courbe n'évolue qu'en rapport avec les doses de sulfamide. Ce fait se manifeste surtout à partir des taux compensateurs au-delà de 100 γ/ml de sulfamide et inférieurs à 0,050 γ/ml de Pénicilline.

Contrôle de l'activation catalytique en présence de Biostimulines :

Pour réaliser cette expérience nous avons procédé comme pour l'étude de l'activation catalytique, en employant comme activateur le *Cobalt*, comme antibiotique la *Pénicilline* et comme bactérie-test *Staphylococcus aureus PCI 209 P ;* nous avons ajouté à nos milieux 3 ml d'extrait de germes de maïs.

Les concentrations de Pénicilline allaient en décroissant, alors que la dose de Cobalt était de 0,10 mg/ml pour tous les tubes. D'autre part, nous avons mis en parallèle un essai à l'aide de *notre Staphylocoque doré producteur de Pénicillinase.* Nous donnons dans le tableau suivant les résultats de ces expériences.

Dans le graphique exprimant ces résultats, nous avons porté en abscisse les % de transmission allant de 95 % à 50 % et en ordonnée les doses de Pénicilline de 0,6 à 0,06 γ/ml. Nous y avons reporté les trois courbes obtenues antérieurement ayant trait à l'action des trois doses de Cobalt (0,05 — 0,10 et 0,15 mg/ml) mises en œuvre dans notre premier essai, ainsi que la courbe témoin indiquant la croissance du *Staphylocoque doré PCI 209 P* sur milieu sans Cobalt. En répétant ces expériences en présence de Biostimulines, *on se rend compte de l'activité synergique de la Biostimuline avec le Cobalt ;* celui-ci catalyse la croissance du germe-test qui devient ainsi beaucoup plus sensible à la Pénicilline et est déjà inhibé à des doses de Pénicilline entre 0,03 et 0,24 γ/ml; *par contre, le Staphylocoque producteur de Pénicillinase semble insensible au Cobalt et à la Pénicilline et fait preuve d'un bon développement en présence de 0,6 γ/ml d'antibiotique et de Biostimuline.*

TABLEAU N° 15

Pénicilline γ/ml	% de transmission			
	Staphylocoque doré PCI 209 P			St. producteur de Pénicillinase
	Témoin sans Cobalt	Témoin avec Cobalt	Épreuve à la Biostimuline	Épreuve à la Biostimuline
0,6	95	95	95	80
0,54	95	92	95	68
0,48	94	83	95	61
0,42	92	78	94	57
0,36	90	73	94	54
0,30	86	67	92	52
0,24	78	62	90	51
0,18	70	57	88	50,5
0,12	60	53	82	50
0,06	54	50	65	50
0,0	50	50	60	50

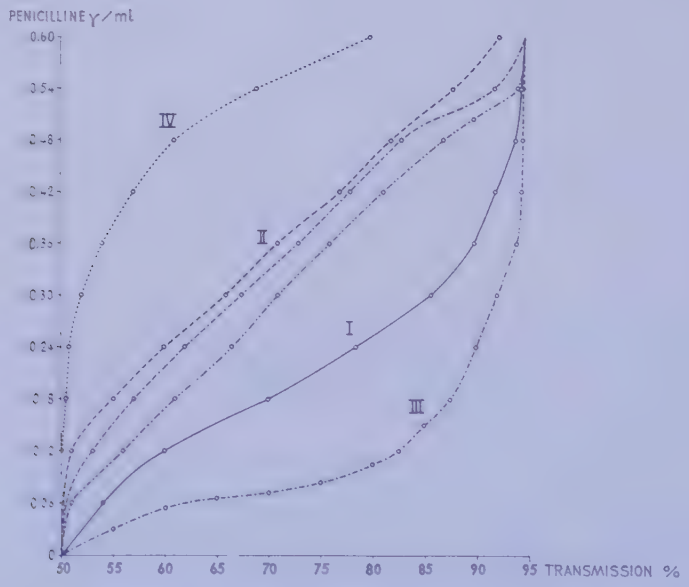

Fig. 11 Activation catalytique du Cobalt sur la Pénicilline.
Bactérie-test : Staphylococcus aureus pénicillino-sensible.

Courbe I ——————— : témoin avec St. aureus PCI-209 P.

Courbes II (3 courbes) avec St. aureus PCI-209 P et Pénicilline en présence de 0.05, 0,10 et 0,15 mg/ml de Cobalt.

Courbe III — - — - — - : Expériences avec St. aureus PCI-209 P en présence de 0.10 mg/ml de Cobalt + Biostimuline.

Courbe IV - - - - - - - - - - : Expérience avec Staphylocoque producteur de Pénicillinase en présence de 0,10 mg/ml de Cobalt + Biostimuline.

On voit ainsi que l'effet d'un produit catalysant l'activité d'un antibiotique dépend en premier lieu du germe en expérience; d'autre part, le synergisme entre l'antibiotique et la Biostimuline est, lui aussi, tributaire du germe.

Contrôle de l'antagonisme en présence de Biostimulines :

L'exemple que nous avions choisi dans le chapitre précédent pour démontrer ce processus était constitué par l'association de la *Sulfadiazine* comme antibactérien et de l'*Acide para-aminobenzoïque* (PAB). Comme bactérie-test nous nous sommes adressés à *Bacillus subtilis ATCC* 6633. Nous avons répété cette première expérience en ajoutant 3 ml de Biostimulines dans chaque tube des gammes d'expérience.

Dans le tableau suivant nous rapportons le protocole expérimental et les résultats de cet essai :

TABLEAU N° 16

Sulfadiazine γ/ml	PAB γ/ml	% de transmission	
		Sulfadiazine seule	Sulfadiazine + PAB + Biostimulines
0,025	0,0	50	50
0,050	2,0	55	65
0,10	4,0	60	66
0,20	8,0	64	65
0,40	16,0	71	65
0,80	32,0	75	64
1,60	64,0	81	68
3,20	125,0	86	72
6,40	250,0	90	76
12,80	500,0	95	80

(Voir figure N° 5 courbe III, page 57)

Dans le graphique (page 57) nous avons inscrit en abscisse les différentes doses de PAB et de Sulfadiazine; en ordonnée nous avons rapporté les pourcentages de transmission lus. La courbe témoin illustrant l'action antibactérienne de la Sulfadiazine seule, évolue selon une droite.

Quant à l'antagonisme entre le PAB et la Sulfadiazine, nous notons pour les doses faibles (de 0,025 à 0,20 γ/ml de Sulfadiazine) une augmentation de l'action frénatrice de cette dernière, due à la présence de la Biostimuline. Ceci s'explique, puisque nous avons affaire à un bactériostatique; *la présence de Biostimuline favorisant la multiplication du germe-test, l'antagonisme entre le sulfamide et le PAB devient moins prononcé et l'activité antibactérienne s'exerce d'une façon plus marquée.*

Dans les zones de 0,10 à 0,80 γ/ml, nous constatons un simple décalage de la courbe de croissance microbienne par rapport à celle de l'essai sans Biostimulines. L'inaction du PAB devient cependant plus manifeste au-delà de la dose de 32 γ/ml, puisque entre cette limite et 100 γ/ml son effet s'estompe proportionnellement, de façon à ce que la courbe évolue parallèlement à celle de la Sulfadiazine seule, avec un décalage de 15° opacimétriques environ.

Nous ne pouvons expliquer ce phénomène que par l'action de la Biostimuline qui, en agissant sur la multiplication de la bactérie-test, permet au produit bactériostatique d'intervenir pleinement dans la phase exponentielle de croissance. L'indice d'inhibition de PAB/Sulfadiazine étant normalement de 1/250 à 1/400, il est augmenté jusqu'à 1/60 environ en présence de Biostimulines, et ceci surtout pour de faibles doses.

Contrôle de l'interférence en présence de Biostimulines :

Nous référant à l'expérience effectuée *sans Biostimuline*, nous avons employé l'association *Chloramphénicol + Sulfathio-urée* et comme bactérie-test *Staphylococcus aureus PCI 209 P.* Cependant les doses de Chloramphénicol ont été échelonnées entre 0.1 à 51 γ/ml. La Biostimuline a été introduite à raison de 3 ml par tube dans le milieu de Frœhlich modifié. Nous rapportons dans le tableau suivant le protocole expérimental et les résultats obtenus :

TABLEAU N° 17

Concentrations en γ/ml		% de transmission			
Chloramphénicol	Sulfathio-urée	Chloramph. seul I	Chloramph. + Sulfathio-urée II	Chloramph. + Biostim. III	Chloramph. + Sulfath. + Biostim. IV
0,0	0,0	55	55	55	55
0,10	0,5	56	55	60	78
0,20	1,0	55	56	65	83
0,40	2,0	56	57	71	84
0,80	4,0	57	58	77	85
1,60	8,0	58	59	82	85
3,20	16,0	61	74	87	84
6,40	32,0	64	80	90	85
12,80	54,0	67	80	93	85
25,60	128,0	80	86	94	88
51,20	256,0	95	95	95	95

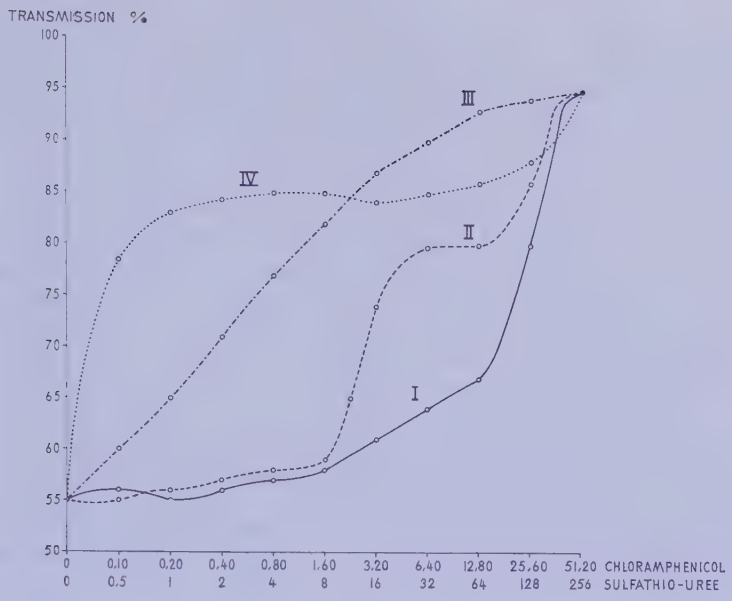

Fig. 12

Exemple d'interférence entre : Chloramphénicol + Sulfathio-urée + Biostimuline.
Bactérie-test : Staphylococcus aureus PCI-209 P.

Courbe I ———————— : Chloramphénicol seul.

Courbe II - - - - - - - - - - : Chloramphénicol + Sulfathio-urée.

Courbe III - — - — - — - : Chloramphénicol + Biostimuline.

Courbe IV ..... : Chloramphénicol + Sulfathio-urée + Biostimuline.

Dans ce graphique, nous portons en abscisse les doses progressivement croissantes de Chloramphénicol de 0,10 à 51,20 γ/ml et celles de 0,5 à 256 γ/ml de Sulfathio-urée et sur l'ordonnée nous lisons les pourcentages de transmission obtenus.

En comparant les courbes N° I et II, on constate que l'association *antibiotique + sulfamide* amène une *activité antibactérienne synergique* à partir de 8 γ/ml de sulfamide et de 1,60 γ/ml d'antibiotique. En dessous de ces concentrations, nous ne notons aucune action cumulatrice, mais plutôt une *interférence entre le Chloramphénicol et le Sulfathio-urée.*

En ce qui concerne l'association *antibiotique + Biostimuline* (courbe III) on voit une nette action antibactérienne aux taux inférieurs à 6,4 γ/ml d'antibiotique. On sait que l'effet bactéricide *du Chloramphénicol* se situe pour les bactéries Gram-positives à 33 γ/ml environ. En présence de la Biostimuline l'activité bactéricide devient manifeste à partir de 12,80 γ/ml du moins dans nos conditions expérimentales. Ce fait avait déjà été observé par Faudi, qui a remarqué *que l'action de*

certains antibiotiques semble être potentialisée par l'extrait de germes de maïs ; il s'agissait de la *Tifomycine, de l'Auréomycine, de la Terramycine et de la Tétracycline*, mais cet auteur fait remarquer que cette augmentation d'activité est fonction du germe et de la souche étudiée et n'est valable, dans son cas, que pour *le Staphylocoque doré pénicillino-sensible.*

Quant à la courbe IV, où nous avons associé *nos deux produits antibactériens à la Biostimuline*, nous notons une *action frénatrice très prononcée* dans les zones des petites doses (0,20 γ/ml de Chloramphénicol et 1 γ/ml de sulfamide); dans cette zone, la Biostimuline favorisant la multiplication des bactéries permet au sulfamide d'opérer une synergie avec l'antibiotique, lequel agit également comme un bactériostatique. Ce synergisme s'exprime dans la courbe jusqu'à la dose de 12,80 γ/ml de Chloramphénicol; en dessous de cette dose et jusqu'à 0,40 γ/ml la courbe évolue en plateau et les taux de Sulfathio-urée produisent dans toute cette zone *un phénomène d'interférence.* C'est seulement à partir d'environ 20 γ/ml de Chloramphénicol que cet antibiotique agit comme bactéricide et dans ces conditions *l'action du sulfamide et de la Biostimuline est éliminée.* Cet exemple nous a permis de démontrer le rôle de la Biostimuline dans les *associations de bactéricides et de bactériostatiques.*

Contrôle de l'action frénatrice en présence de Biostimulines :

Nous reprenons ici encore l'exemple du chapitre précédent en ce qui concerne cette action, où nous avions associé *la Pénicilline à la Terramycine.* Nous avons pu mettre en évidence, grâce au *Staphylococcus aureus PCI 209 P*, que *la Pénicilline*, considérée comme bactéricide, est nettement freinée dans son activité par *la Terramycine* qui est un bactériostatique à *action antibactérienne immédiate.* Comme d'habitude, nous avons ajouté 3 ml de Biostimulines à chaque tube.

TABLEAU N° 18

Concentrations en γ/ml		% de transmission		
Terramycine	Pénicilline	Terramycine	Terramycine + Pénicilline	Terramycine + Pénicilline + Biostimuline
0,05	0,0	67	67	80
0,10	0,06	75	75	85
0,20	0,12	87	87	93
0,40	0,18	91	91	95
0,80	0,24	93	93	85
1,60	0,30	94	94	80
3,20	0,36	95	95	80
6,40	0,42	95	95	83
12,8	0,48	95	95	95
25,6	0,54	95	95	95
51,2	0,60	95	95	95

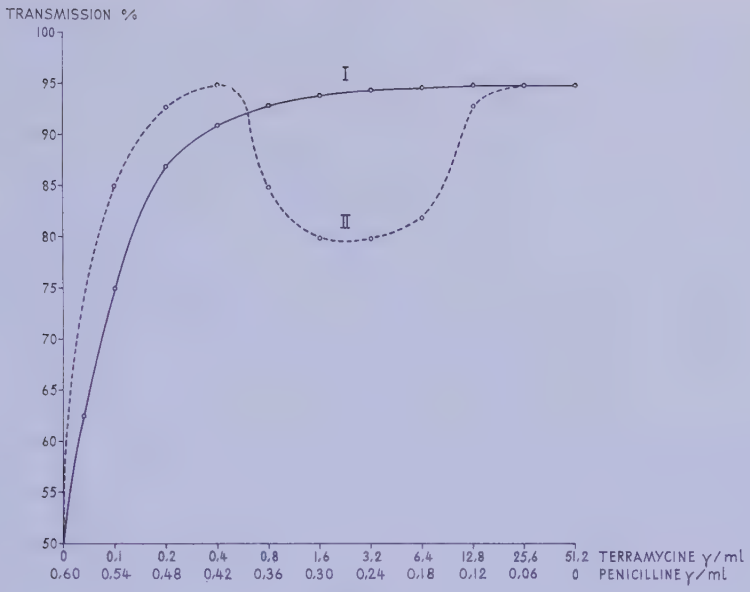

Fig. 13

Exemple des actions frénatrice et synergique alternatives entre : Terramycine + Pénicilline + Biostimuline.

Bactérie-test : Staphylococcus aureus PCI-209 P.

Courbe I ———— : **Terramycine seule et Terramycine + Pénicilline.**

Courbe II - - - - - - - - - - : **Terramycine + Pénicilline + Biostimuline.**

En considérant ce graphique, on voit tout d'abord que *la Terramycine annule l'action de la Pénicilline*, puisque les deux courbes se couvrent absolument. L'action bactériostatique définitive de *la Terramycine* s'inscrit entre 1,6 et 3,2 γ/ml ; à partir de ces concentrations, la courbe évolue en plateau et son allure ressemble sensiblement à celle que nous avons obtenue avec *la Pénicilline associée à la Biostimuline ;* on voit que *la Terramycine* agit à des doses relativement faibles.

En comparant cette courbe témoin avec celle obtenue par l'association des trois produits en expérience, on constate tout d'abord que *la Biostimuline, en activant le développement du Staphylocoque, permet à la Pénicilline de jouer son rôle d'inhibiteur.* Mais le synergisme des deux antibiotiques en présence de l'extrait biogène devient manifeste seulement jusqu'aux doses de 0,42 γ/ml de Pénicilline et 0,40 γ/ml de Terramycine. A ce moment, nous assistons, non plus à un synergisme d'action, mais à une *interférence* entre les deux antibiotiques, puisqu'en présence de la Biostimuline la courbe de croissance du Staphylocoque redevient positive ; et ceci entre 0,80 γ/ml à 6,40 γ/ml de Terramycine et 0,36 à 0,18 γ/ml de Pénicilline ; à ce stade, le développement du Staphylocoque s'exprime

par un plateau à 80° opacimétriques. Les taux dépassant 6,40 γ/ml de Terramycine ont de nouveau une action frénatrice sur la Pénicilline, et ainsi l'effet des Biostimulines ne peut plus s'exercer. A partir de 12,80 γ/ml de Terramycine, l'action bactériostatique de celle-ci est optimale.

Ainsi l'exemple que nous avons choisi démontre que, pour *certaines bactéries Gram-positives pénicillino-sensibles, la Biostimuline favorise l'activité antimicrobienne de la Pénicilline dans des zones nettement délimitées*, de sorte que l'action frénatrice de l'association bactéricide + bactériostatique s'exprime par un certain synergisme. Mais à des taux plus forts, *l'extrait biogène diminue nettement l'effet antimicrobien des deux antibiotiques associés*, phénomène que nous avons déjà constaté antérieurement pour *le Chloramphénicol et le Sulfathio-urée, et qui s'exprime par des actions synergiques et frénatrices alternatives.*

Après avoir ainsi étudié *l'interaction entre des antibiotiques biologiques et chimiothérapiques*, nous croyons pouvoir conclure que ces associations peuvent être *synergiques* ou *antagonistes*, suivant le choix des produits antibactériens mêmes, mais surtout en rapport avec les bactéries mises à l'épreuve. *L'addition de Biostimulines agissant sur la croissance des germes en diminuant la phase de latence et en favorisant le démarrage de la multiplication est à recommander chaque fois que l'on associe deux antibiotiques, dont l'un agit immédiatement et l'autre plus tardivement.*

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Notre travail a eu comme but l'étude de deux problèmes : *le comportement des différents antibiotiques biologiques et chimiothérapeutiques, les uns vis-à-vis des autres ; l'influence éventuelle des facteurs de croissance tels que les Biostimulines ou Stimulines biogènes selon* FILATOV *sur l'activité antimicrobienne d'un antibiotique donné ou d'un mélange de deux produits antimicrobiens.*

Pour les deux problèmes posés, on peut se demander si l'association de deux antibiotiques ou d'antibiotiques + extrait biogène a pour résultat une action synergique ou antagoniste sur l'effet antimicrobien.

C'est pour cette raison que nous avons donné dans la *partie historique* de notre travail un aperçu général des substances antibactériennes, de l'antagonisme qu'elles peuvent exercer les unes sur les autres et de l'antagonisme entre ces produits et les facteurs de croissance. Notre plan de travail donne l'ordonnancement chronologique de cette partie historique.

Les *travaux personnels* comportent quatre chapitres. Nous avons tenu à décrire tout d'abord nos méthodes de dosage de l'activité des antibiotiques et des Biostimulines. Pour tous nos essais, nous avons eu recours à des méthodes microbiologiques. Les dosages du pouvoir antimicrobien des antibiotiques étaient effectués au moyen de bactéries-test spécifiques pour chacun de ces produits; c'est ainsi que nous avons employé différentes souches de *Staphylococcus aureus* et de *Bacillus subtilis* en nous basant sur les données établies par convention adoptée lors des *Congrès Internationaux de Microbiologie.*

Le contrôle et la standardisation des extraits biogènes ont été réalisés grâce aux méthodes mises au point par FAUDI et ILLIEN à l'aide de *Zymomonas mobile, Lindner* comme bactérie-test spécifique.

En nous référant aux travaux de MANTEN et WISSE, puis de P. KLEIN, nous avons étudié l'effet synergique additif ou antagoniste de deux produits antibactériens ou du mélange d'antibiotiques + Biostimuline, en distinguant l'activité des groupes d'association selon les principes pharmacologiques par leur *synergisme additif, potentialisation, activation catalytique, antagonisme, interférence et action frénatrice.*

Parmi les nombreuses expériences effectuées, nous avons choisi pour chaque groupe un cas typique comme exemple. C'est ainsi que pour le *synergisme additif*, nous avons associé le *Sulfathio-urée* et la *Pénicilline* et leur pouvoir antimicrobien a été testé par *Staphylococcus aureus PCI-209 P* pénicillino-sensible et par un *Staphylococcus aureus de la collection de* CHABERT, *producteur de Pénicillinase*, employé en inoculat faible.

La même expérience, effectuée en présence de *Biostimuline*, nous a révélé que, dans ce cas, il n'y avait plus *synergisme additif*, mais *phénomène de potentialisation* en ce qui concerne les *Staphylocoques pénicillino-sensibles*, alors qu'en présence des *Staphylocoques producteurs de Pénicillinase*, l'extrait biogène est sans influence sur l'activité antimicrobienne ou provoque même une résistance accrue. Nous avons tenté d'expliquer ce phénomène par le fait que l'extrait biogène favorise la multiplication des germes, mais en même temps une sécrétion accrue de Pénicillinase.

Pour démontrer *l'effet de potentialisation*, nous avons encore choisi l'association *Pénicilline* + *Sulfathio-urée* en employant comme bactérie-test *Staphylococcus aureus PCI-209 P pénicillino-sensible*. Nous avons ainsi constaté que la dose frénatrice de *la Pénicilline* en présence de doses croissantes de sulfamide tombe de 75 % à 6 %, c'est-à-dire à 1/12e en présence d'une bactérie pénicillino-sensible. *On voit ainsi que l'effet de la Pénicilline est potentialisé par la présence de sulfamides* et ceci parce que nous avons affaire à deux bactériostatiques, nécessitant sensiblement les mêmes temps de latence pour certaines bactéries données.

L'adjonction de Biostimuline augmente encore ce phénomène de potentialisation.

Comme exemple de *l'activation catalytique* nous avons choisi la *Pénicilline* additionnée de traces de *Cobalt* en employant comme bactérie-test *Staphylococcus aureus PCI-209 P*. Le Cobalt étant en lui-même inactif, nous avons essayé d'expliquer l'activité accrue de la Pénicilline *par la stimulation de la genèse de la Vitamine B_{12} sous son influence*. Celle-ci agit comme facteur de croissance et en activant la multiplication du Staphylocoque par raccourcissement de la phase de latence. Ainsi, la Pénicilline peut exercer sur le germe en multiplication très prononcée une activité antibiotique optimale.

L'introduction de Biostimuline dans le même substrat stimule encore l'activité du Cobalt et le Staphylocoque devient beaucoup plus sensible à la Pénicilline; *par contre le Staphylocoque producteur de Pénicillinase semble insensible au Cobalt et à la Pénicilline.*

L'action *d'un produit catalysant* l'activité d'un antibiotique dépend en premier lieu du germe en expérience: le synergisme entre l'antibiotique et la Biostimuline est lui aussi tributaire du germe.

L'exemple typique pour démontrer *l'antagonisme* met en jeu la *Sulfadiazine et l'acide para-aminobenzoïque* (PAB) en présence de *Bacillus subtilis ATCC* 6633. Nous avons constaté qu'il y a un rapport proportionnel entre les concentrations de Sulfamide et du PAB, de sorte que la croissance du germe-test est sensiblement égale pour toute la gamme mise à l'épreuve. Il s'agit donc là d'un *antagonisme compétitif.*

En associant à ce mélange la *Biostimuline, nous notons une diminution de l'action frénatrice de la Sulfadiazine* : l'antagonisme entre le sulfamide et le PAB devient plus prononcé et l'activité antibactérienne s'exerce d'une façon plus marquée. Dans la zone des doses faibles, nous consta-

tons un simple décalage des courbes de croissance microbienne et vers des doses plus fortes, l'inaction du PAB devient encore plus manifeste, puisqu'au-delà du taux de 0,032 γ/ml, son effet s'estompe progressivement. L'indice d'inhibition du PAB/Sulfadiazine étant normalement de 1/400 environ, est augmenté jusqu'à 1/60 en présence de la Biostimuline.

Comme exemple du phénomène *d'interférence*, nous avons retenu l'association *Chloramphénicol + Sulfathio-urée* en présence de *Staphylococcus aureus PCI*-209 *P.* Le Chloramphénicol agit sur ce germe comme bactéricide. Les différentes doses de Chloramphénicol ont été introduites 5 heures après l'ensemencement et le sulfamide est employé à des doses progressivement croissantes. Nous notons que l'activité frénatrice du Chloramphénicol sur la croissance *du Staphylocoque* est augmentée jusqu'à 8 fois en présence de certaines doses de Sulfamide ; l'effet maximal est atteint seulement à des concentrations de 7,5 à 32 γ/ml de sulfamide. L'épreuve de comparaison a été faite avec des doses fixes de 6,00 γ/ml de Chloramphénicol, et des doses progressivement croissantes de sulfamide sont alors sans action, *d'où nous pouvons conclure que le phénomène d'interférence est seulement provoqué par certaines doses de Chloramphénicol* se situant au-delà de 20 γ/ml.

En présence *de Biostimuline* l'activité bactéricide du Chloramphénicol seul est *potentialisée*, alors qu'en présence de sulfamide, l'extrait biogène, favorisant la multiplication des bactéries, permet à ce dernier d'exercer une *synergie* avec le Chloramphénicol, lequel agit dans ces conditions comme un bactériostatique ; ce synergisme est manifeste jusqu'à la dose de 12,80 γ/ml de Chloramphénicol ; en dessous de cette dose, la courbe évolue en plateau, et le Sulfathio-urée produit dans toute cette zone un phénomène d'interférence. C'est seulement à partir de 20 γ/ml de Chloramphénicol que cet antibiotique agit comme bactéricide et dans ces conditions, l'action du sulfamide et de la Biostimuline est éliminée.

Pour démontrer l'*action frénatrice* d'une association d'antibiotiques, nous avons mis en jeu la *Pénicilline* et la *Terramycine* en présence du *Staphylococcus aureus PCI* 209 *P.* En effet, *la Terramycine* exerce une action frénatrice sur *la Pénicilline*, puisqu'elle a un effet antibactérien immédiat freinant le développement du *Staphylocoque.* Sachant que la Pénicilline ne peut agir que sur des germes en phase exponentielle, nous comprenons la suppression de son action, comme elle ressort de notre expérience.

En effectuant le même essai en présence *de Biostimuline*, on constate tout d'abord que la Biostimuline, en activant le développement du *Staphylocoque*, permet à la Pénicilline de jouer son rôle d'inhibiteur. Mais ce *synergisme d'action* des deux antibiotiques en présence de Biostimuline n'est manifeste que pour les petites doses ; au-delà de 0,54 γ/ml de Pénicilline et 0,40 γ/ml de Terramycine on assiste à une *interférence* entre les deux antibiotiques et la courbe de développement *du Staphylocoque* s'exprime par un plateau. Au-delà de 6,40 γ/ml de Terramycine, on note de nouveau une *action frénatrice* sur la Pénicilline.

Ainsi cet exemple démontre que pour certaines *bactéries Gram-positives pénicillino-sensibles*, la Biostimuline favorise l'activité antimicrobienne de la Pénicilline dans des zones nettement délimitées, de sorte que l'action frénatrice de l'association bactéricide + bactériostatique s'exprime par un certain synergisme. Mais à des taux plus forts, l'extrait biogène diminue nettement l'effet antimicrobien de deux antibiotiques associés, *phénomène qui s'exprime donc par des actions synergiques et frénatrices alternatives.*

De tous ces exemples, nous croyons pouvoir conclure que les associations d'antibiotiques biologiques et chimiothérapiques peuvent être *synergiques ou antagonistes* suivant le choix des produits antibactériens mêmes, mais surtout en rapport avec les bactéries mises à l'épreuve. *L'addition des Biostimulines, qui agissent sur la croissance des germes en diminuant la phase de latence et en favorisant le démarrage de la multiplication, est à recommander chaque fois que l'on associe deux antibiotiques dont l'un agit immédiatement et l'autre plus tardivement.*

BIBLIOGRAPHIE

(7) Andersen W. H. et Booderson T. — Proc. Soc. Exp. Biol. Méd., 1949, 70, 322.

(16) Carpentier E. — Arch. Biochem., 1950, 27, 489.

(9) Cavazutti F. et Lepi P. — Giorn. Batt. Immunol., 1948, 33, 67.

(36) Chabert et Sureau. — Annales Institut Pasteur, juin 1949, 76, 562.

(26) Common. — Cité par Bustinza Luchiando : *Les Antibiotiques antimicrobiens et la Pénicilline.* Éd. La Baconnière, Neuchâtel, 1946, p. 78.

(10) Delaunay M. et Schlaepfer J. — Rev. Immunologie, 1948, 12, 369.

(30) Dittmer et du Vigneaud. — Science, 1944, 11 août, 129-131.

(1) Domagk. — Angewandte Chemie, 1935, 48, 657.

(31) Dubos. — Journ. exp. Méd., 1937, 66, 101 et 113.

(13) Faudi J.-G. — *Étude biologique et thérapeutique d'une Biostimuline d'origine végétale (Stimulines biogènes selon Filatov).* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1957.

(22) Fildes P. — Brit. Journ. exp. Pathol. 1938, 19, 239, 1940, 20, 57.

(37) Frœhlich M. — *Contribution à la culture du Staphylocoque.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1948.

(19) Gastinel P. — *Précis de Bactériologie médicale*, Masson, Paris, 1957, p. 1202.

(35) Gibbs et Demoss. — Journ. Biol. Chem. 1954, 207, 689.

(6) Hauduroy et Rosset. — Revue Tuberculose, 1946, 10, 5-6.

(33) Illien R. — *Contrôle et standardisation d'extraits biogènes d'origine animale.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1961.

(23) Mc Ilwain. — Lancet, 1943, 10 avril, 449-451.

(28) Mc Ilwain et Hawkin. — Lancet, 1943, 10 avril, 449.

(27) Iwanovics G. — Orvosi Hetalap., 1949, 90, 289.

(18) Jawetz, Gunnison et Coleman — Science, 1950, 11, 254; Brit. Med. Journ. Édit., 1950, 2, 1160.

(25) Keilin et Mann. — Proc. of the Nutrition Soc., 1944, Vol. I, N° 3-4, p. 189-192.

(34) Klein P. — *Bakteriol. Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis.* Springer, Berlin, 1957.

(5) Lissot, Richou et Gerbeaux — Bull. Acad. Vétér., 1950, 23.

(20) Lockwood, Youg, Bouchelle, Bryant et Stojowski — Ann. Surgery, 1949, 129, 14-21.

(38) Lwoff. — *Évolution physiologique. Étude des pertes de fonction chez les micro-organismes*, Herrmann, Paris, 1943.

(32) Manten A. et Wisse M.J. — Nature, 1961, 192, 4803, p. 671-2.

(24) Meldrum et Raughton. — Cité par Bustinza-Lachiando : *Les antibiotiques antimicrobiens et la Pénicilline. Éd.* La Baconnière, Neuchâtel, 1946, p. 78.

(8) Meyer J., Burlet E. et Faudi J.-G. — Bull. Acad. Méd., 1955, 23-24, p. 407.

(3) Mœller et Schwarz. — Ber. Deutsch. Chem. Gesell., 1941, 74, 1612.

(14) Povlotzkaya et Skorogotova. — Biochemia, 1947, 12, 226.

(12) Ramon G. et Richou R. — C. R. Acad. Sciences, 1947, 224, 1407; 225, 344. Revue Immunologie, 1947, 11, 133.

(11) Remlinger P. et Bailly J. — C. R. Acad. Sciences, 1946, 223, 118.

(4) Richou R. et Gerbeaux. — Canadian Journ. of comparative Med., 1952, Vol. 16 N° 9, p. 311.

(15) Rickers. — Voir: Cordier R.: *Contribution à l'étude de la vitamine* B_{12}. Thèse Doct. Méd., Lyon, 1949.

(2) Rubbo et Gillespie. — Nature, 1940, 146, 838.

(17) Velu C. — Thèse Doct. Méd., Paris, 1949.

(21) Woods. — Arch. Ophtalm., 1951, 45, 507.

(29) Wyss. — Journ. Bactériol., 1943, 46, 483.

Vu, Strasbourg, le 12 septembre 1963

Le Président du Jury,

R. SARTORY.

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 23 septembre 1963

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
Pour le Doyen,
L'Assesseur
J. SCHREIBER.

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 27 septembre 1963

Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université,

Pour le Recteur
Le Vice-Président du Conseil de l'Université,

F. WENDEL.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 5

PLAN DE TRAVAIL 9

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

Les substances antibactériennes

Désinfectants 11
Antiseptiques 11
Agents chimiothérapeutiques et antibiotiques 12
Mode d'action des substances chimiques antibactériennes 13

CHAPITRE II

Antagonisme entre les facteurs de croissance et les substances antibactériennes 19

CHAPITRE III

Les antibiotiques proprement dits et leurs antagonismes

Les sulfamides 25
Les antibiotiques 31

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE IV

Dosage des antibiotiques et sulfamides

Dosage de la Pénicilline 35
Dosage du Chloramphénicol 35
Dosage des sulfamides 40

CHAPITRE V

Dosage des Biostimulines 45

CHAPITRE VI

Contrôle de l'interaction des substances antibactériennes 49

Synergisme additif 49
Potentialisation 52
Activation catalytique 54
Antagonismes 55
Interférence 57
Action frénatrice 61

CHAPITRE VII

Influence des Biostimulines sur l'interaction des substances antibactériennes 63

Contrôle du synergisme additif en présence de Biostimuline 64
Contrôle de la potentialisation en présence de Biostimuline 66
Contrôle de l'activation catalytique en présence de Biostimuline 67
Contrôle de l'antagonisme en présence de Biostimuline 69
Contrôle de l'interférence en présence de Biostimuline 70
Contrôle de l'action frénatrice en présence de Biostimuline 72

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 75
BIBLIOGRAPHIE 79

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
Dépôt légal N° 3143/63